

# Er cysteinproteaser involvert i statinindusert myotoksisitet?

Anette Larsen Voreland



Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

# Er cysteinproteaser involvert i statinindusert myotoksisitet?

Masteroppgave i farmasi

**Anette Larsen Voreland**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

## **Veiledere:**

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Professor Hege Thoresen

Stipendiat Robert Smith

© Anette Larsen Voreland

2013

Er cysteinproteaser involvert i statinindusert myotoksisitet?

Anette Larsen Voreland

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Rigmor Solberg, professor Harald Thidemann Johansen, professor Hege Thoresen og stipendiat Robert Smith.

Først og fremst vil jeg takke mine hovedveiledere Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen for unik hjelp og veiledning dette året. Takk for at det alltid har vært mulig å be om hjelp underveis, og for alle sene ettermiddager som har gått med på å veilede meg i riktig retning under hele skriveprosessen. Takk til Hege Thoresen for et godt samarbeid med Muskelbunten, og for en fantastisk flott innsats på Holmenkollstafetten. En spesielt stor takk rettes til Robert Smith for upåklagelig tålmodighet underveis i opplæringen, og for fantastisk støtte og oppmuntring de dagene motivasjonen ikke har vært på sitt aller beste. Takk for et morsomt og godt samarbeid!

Jeg vil også takke Hilde Nilsen for god opplæring i det praktiske arbeidet på laboratoriet, oppmuntrende samtaler, og for å ha fullført aktivitetsmålingene for meg. Takk til Camilla Stensrud for utallige dyrkingsmedier som har blitt ferdigblandet, og til Siri Johannesen for frakting av nye kaffeposer de gangene tørstekrisen har rammet kafferommet.

Dette året hadde virkelig ikke vært det samme uten den herlige gjengen i 4. etasje, og alle de fornuftige kaffepausene. Takk for alle de smakfulle bursdags- og fredagskakene, og for underholdende allsang, fellesdans og til tider ustoppelige latterkramper med gjengen på kontor 405.

Takk til mamma og pappa som ikke har gitt meg opp i løpet av disse fem årene på Farmasøytisk Institutt, og en spesielt stor takk til min kjære venn Elisabeth Brekke Nielsen som har heiet på meg hele veien, og gitt meg mye latter og unikt pågangsmot gjennom hele studiet.

Blindern, mai 2013

Anette Larsen Voreland

# Sammendrag

Hyperlipidemi er en økende risikofaktor for utvikling av hjerte- og karsykdommer, og statiner (HMG-CoA-reduktasehemmere) er i stor grad brukt som medikamentell behandling mot dette. Statiner er generelt godt tolerert, men i noen tilfeller kan legemiddelgruppen føre til myotoksisitet, fra mild myopati til alvorlig rabdomyolyse. Mekanismen bak statinindusert myotoksisitet er ikke klarlagt, og flere hypoteser har blitt testet. Hovedfokuset i denne oppgaven har vært legumain, en cysteinprotease som har stor strukturlikhet med caspasene involvert i apoptose. Det var av interesse å studere hvilken effekt simvastatin hadde på legumain, samt andre cysteinproteaser (cathepsin B og L), i primære humane myotuber.

Primære humane skjelettmuskelceller isolert fra *M. obliquus abdominis* fra friske frivillige donorer ble benyttet som cellemodell. Effekten av simvastatin ble studert etter behandling i 48 timer på dag 5 av differensieringen av myotubene. For å se om simvastatineffekten skyldtes en hemming av HMG-CoA-reduktasen, ble myotubene behandlet med simvastatin og mevalonolakton (ML), geranylgeranylpyrofosfat (GGPP) eller farnesylpyrofosfat (FPP). Legumain, cathepsin B og L ble analysert i cellelysater ved immunblotting, real-time-PCR, ELISA og enzymaktivitetsmåling. Lokaliseringen av legumain, cathepsin B og L ble undersøkt ved subcellulær fraksjonering og konfokalmikroskopi.

Resultatene viste at simvastatin reduserte aktiviteten av både legumain og cathepsin B i myotubene. Ekspresjonen av aktiv legumain og -cathepsin B ble redusert i myotubene etter simvastatinbehandling, mens aktiv cathepsin L holdt seg stabil. Proformene til både legumain, cathepsin B og L økte etter samme behandling. Real-time-PCR viste ingen endring i hverken legumain- eller cathepsin B mRNA etter simvastatinbehandling, men en tendens til økt cathepsin L mRNA ble vist. Videre ble både legumain, cathepsin B og L uttrykt kun i membranfraksjonen etter subcellulær fraksjonering, og ingen lekkasje av cysteinproteasene ble observert etter simvastatinbehandling. Dette ble i tillegg bekreftet med konfokalmikroskopi, der legumain kun viste vesikulær lokalisasjon. Simvastatineffekten ble delvis motvirket i myotuber behandlet med simvastatin sammen med ML eller GGPP, noe som tyder på at simvastatin hemmer gentranskripsjonen gjennom hemming av HMG-CoA-reduktasen.

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag .....</b>	<b>5</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Innledning .....</b>	<b>10</b>
1.1 Statiner.....	10
1.1.1 Virkningsmekanisme.....	10
1.1.2 Fysikalsk-kjemiske egenskaper og farmakokinetikk .....	11
1.2 Hyperlipidemi .....	12
1.2.1 Definisjon .....	12
1.2.2 Årsaker .....	13
1.2.3 Behandling .....	13
1.3 Bivirkninger av statiner .....	13
1.3.1 Skjelettmuskulatur.....	14
1.3.2 Symptomer på myotoksisitet.....	15
1.3.3 Interaksjoner.....	15
1.3.4 Hypoteser for mulige statininduserte muskelbivirkninger .....	15
1.4 Cysteinproteaser .....	18
1.4.1 Cathepsin B og L.....	18
1.4.2 Legumain.....	19
1.4.3 Lysosomer og cathepsiner i forhold til apoptose .....	20
1.5 Mål for oppgaven.....	21
<b>2 Materialer og metode .....</b>	<b>22</b>
2.1 Materialer.....	22
2.2 Donorkarakteristika .....	23
2.3 Celledyrking .....	23
2.3.1 Utsåing .....	23
2.3.2 Proliferasjon og differensiering av myoblaster til myotuber .....	24
2.3.3 Stimulering av myotuber .....	24
2.3.4 Høsting av myotuber .....	25
2.4 Totalproteinmåling .....	25
2.5 Enzymaktivitetsmålinger .....	26
2.6 Immunblotting (Westernblotting).....	27

2.6.1	Elektroforese .....	27
2.6.2	Immunblotting .....	27
2.6.3	Reblotting .....	28
2.7	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	29
2.8	Subcellulær fraksjonering .....	29
2.9	Revers-transkripsjon-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR) .....	30
2.9.1	Isolering og kvantifisering av RNA .....	31
2.9.2	Komplementær DNA (cDNA)-syntese .....	31
2.9.3	Real-time-PCR .....	31
2.10	Konfokalmikroskopi .....	32
2.11	Statistiske analyser .....	34
<b>3</b>	<b>Resultat.....</b>	<b>35</b>
3.1	Effekt av simvastatin på legumain- og cathepsin B-aktivitet i myotuber.....	35
3.2	Ekspresjon av legumain, cathepsin B og cathepsin L i primære humane myotuber .	36
3.3	Legumain, cathepsin B og cathepsin L i membranfraksjonen av myotuber .....	39
3.4	Morfologi og konfokalmikroskopistudier av myotuber .....	40
3.5	Effekten av simvastatin på mRNA-ekspresjon av legumain, cathepsin B og L i humane myotuber .....	43
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>45</b>
4.1	Valg av cellemodeller .....	45
4.2	Innvirkning av simvastatin på legumain, cathepsin B og L .....	46
4.3	Lokalisering av legumain i myotuber .....	47
4.4	Simvastatin hemmer autoaktivering av prolegumain .....	49
4.5	Effekten av simvastatin på mRNA-ekspresjonen av legumain, cathepsin B og L ....	50
<b>5</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>51</b>
	<b>Litteraturliste.....</b>	<b>52</b>
	<b>Vedlegg .....</b>	<b>56</b>

# Forkortelser

36B4	“Human acidic ribosomal phosphoprotein PO”
AEP	Asparaginyln endopeptidase
AIF	Apoptoseinduserende faktor
Apaf-1	Apoptotisk peptidaseaktiverende faktor 1
ARSB	Arylsulfatase B
Bax	Bcl-2-assosiert X-protein
Bcl-2	B-cellelymfom 2
β-ME	β-mekarptoetanol
BH	Bcl-2 homologi
BMI	“Body mass index”
C	Caspase
Ca <sup>2+</sup>	Kalsium
cDNA	Komplementært DNA
CE	Ekstraksjonsbuffer
CO <sub>2</sub>	Karbondioksid
CoQ10	Koenzym Q10
CYP	Cytokrom P450
Cyt. C	Cytokrom C
DAPI	“4',6-diamidino-2-phenylindole”
DEPC-H <sub>2</sub> O	Dietylpyrokarbonat-behandlet destillert og autoklavert vann
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
ER	Endoplasmatisk retikulum
F	“Forward”
FPP	Farnesylpyrofosfat
GAPDH	Glyseraldehyd-3 fosfatdehydrogenase
GGPP	Geranylgeranylpyrofosfat
GTPase	Guanintrifosfatase
h	Human



HDL	“High-density” lipoprotein
HEPG2	Hepatocellulært karsinom
H+L	“Heavy & Light Chain”
HMG-CoA	3-hydroksey-3-metylglutaryl-coenzym A
HRP	“Horseradish peroxidase”
IAPs	Apoptosehemmere
ID	Identifikasjon
IF	Immunfluorescens
IgG	Immunoglobulin G
K	Kontroll
kDa	Kilodalton
LAMP2	Lysosomal-assosiert membranprotein 2
LD	Levende donor
LDL	“Low-density” lipoprotein
LDS	Litium dodecylsulfat
MHC	“Major histocompatibility complex”
ML	Mevalonolakton
MMP-2	Matriksmetalloproteinase-2
mRNA	“Messenger”-RNA
PBS	Fosfatbufret saltvann
PC	Procaspase
PRIMO	“Prediction of Muscular Risk in Observation”
R	“Reverse”
RNA	Ribonukleinsyre
RT-PCR	Real-time-polymerasekjedereaksjon
SEM	Standardfeil
SL	Simvastatin(lakton)
TG	Triglyserid
T-TBS	Tris-bufret saltvann og Tween 20
UGT	Uridindifosfat glukuronosyltransferase
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin
Z-Arg-Arg-AMC	Benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-amino-4-metylkumarin

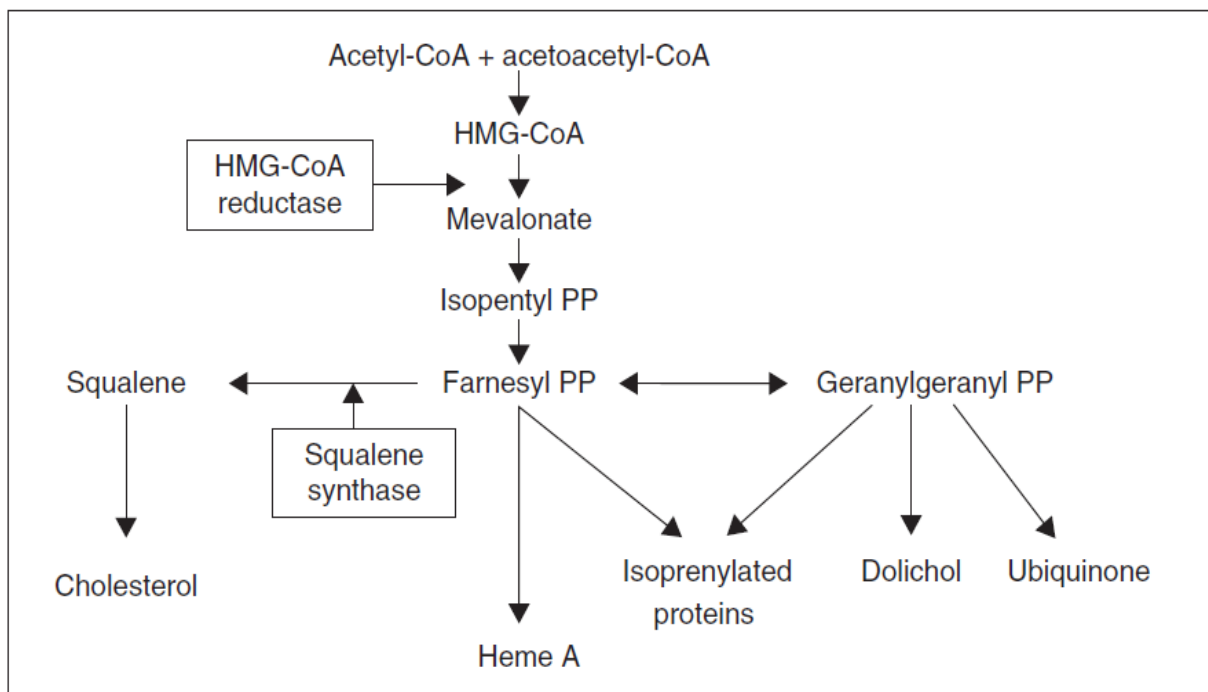
# 1 Innledning

## 1.1 Statiner

Per dags dato finnes det seks ulike statiner på markedet i Norge; simvastatin, atorvastatin, lovastatin, pravastatin, fluvastatin og rosuvastatin. Disse blir brukt mot hyperlipidemi (Kap. 1.2), og etter gjeldende refusjonsregler per 1. juni 2009 er alle doser av simvastatin og 10, 20 og 40 mg av atorvastatin foretrukne statiner i Norge. Det første statinet som kom på markedet i 1987 var lovastatin [1], og helt siden den gang har bruken av statiner vært økende. Omtrent 10 % av den norske befolkningen hentet ut ett av disse preparatene på resept i 2012 [2], og salget av statiner er fremdeles økende for hvert år [3].

### 1.1.1 Virkningsmekanisme

Statiner er spesifikke, reversible og kompetitive hemmere av enzymet 3-hydroksy-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA)-reduktase. Dette er det hastighetsbestemmende enzymet ved omdannelsen av HMG-CoA til mevalonat, som er et forstadium til steroler, inkludert kolesterol (Fig. 1.1).



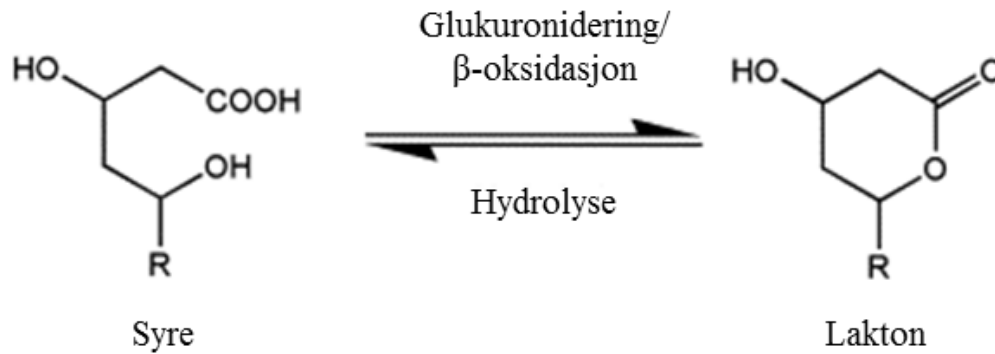
**Figur 1.1: Kolesterolsyntesen.** Statiner hemmer HMG-CoA-reduktasen, og hemmer dermed dannelsen av mevalonat, en forløper til blant annet kolesterol. Figuren er modifisert fra [4].

Hemmingen av HMG-CoA-reduktase medfører en nedsatt egenproduksjon av kolesterol, og en oppregulering av «low density» lipoprotein (LDL)-reseptorene på hepatocytterne slik at LDL får økt opptak i lever. Dette fører til senkning av både LDL og totalkolesterol i serum [5]. I tillegg vises en reduksjon av triglyserider, og en økning av «high density» lipoprotein (HDL)-nivåer i serum ved statinbehandling. Flere store randomiserte studier utført med placebo-kontroll viser positive effekter av HMG-CoA-reduktasehemmere i forhold til både morbiditet og mortalitet [6, 7]. Statiner er vist å redusere den relative risikoen for kardiovaskulære sykdommer med 24-37 %, uavhengig av kjønn, alder, tidligere hjerte- og karsykdommer eller andre komorbide tilstander [8]. En reduksjon i LDL er også vist å være proporsjonal med denne risikoreduksjonen [9]. I tillegg til de etablerte kolesterolsenkende effektene av statiner, indikerer nye studier at statiner utviser pleiotrope effekter, såkalte tilleggseffekter. Blant disse finnes forbedret endotelfunksjon, redusert vaskulær inflammasjon, stabilisering av aterosklerotisk plakk, antitrombotiske effekter, immunsuppresjon og beskyttelse mot sepsis [7, 10]. Om disse effektene er doseavhengige eller en klasseeffekt av statiner er per dags dato ikke kjent.

### 1.1.2 Fysikalsk-kjemiske egenskaper og farmakokinetikk

Statinene som brukes i dag administreres enten som lakton prodrug (lovastatin og simvastatin), eller som aktiv syreform (atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin og pravastatin). En sammenlikning mellom disse to formene viser at laktonformen er mer enn 1000 ganger så lipofil som den respektive syreformen, og det er vist blant de seks forskjellige statinene på markedet i dag at simvastatin er den mest lipofile, og pravastatin den mest hydrofile [11]. *In vivo* vil det for alle statinene dannes en likevekt mellom lakton- og syreform. Omdanningen fra syre- til laktonform er antatt å være mediert av glukuronidering via difosfat-glukuronosyltransferase UGT1A1 og UGT1A3, og/eller  $\beta$ -oksidasjon, mens den motsatte reaksjonen skjer ved hjelp av hydrolyse [12] som vist i figur 1.2.

Alle statinene metaboliseres i lever, noe som er årsaken til den generelt lave biotilgjengeligheten. Lovastatin, simvastatin og atorvastatin metaboliseres via CYP3A4, og fluvastatin primært via CYP2C9 [13, 14]. Metabolismeveien for pravastatin er derimot mest knyttet til fase-2-metabolisme [15], mens metabolismeveien for rosuvastatin ennå ikke er fullstendig klarlagt. Substratet er likevel antatt å metaboliseres noe via CYP2C9 og CYP2C19 [5, 14].



**Figur 1.2 Omdanning *in vivo* fra syre- til laktonform av statiner.** Omdanning fra syre- til laktonform via glukuronidering og/eller  $\beta$ -oksidasjon, og en revers reaksjon via hydrolyse. I denne oppgaven er det brukt simvastatin, så  $R=C_{20}H_{29}O_2$ . Figuren er modifisert fra [11].

## 1.2 Hyperlipidemi

### 1.2.1 Definisjon

Hyperlipidemi, også omtalt som dyslipidemi, er definert som økt innhold av fettstoffer (lipider) i blod. Blodfettet er samlet i partikler (lipoproteiner) som inneholder protein (apolipoproteiner), kolesterol, triglyserider og fosfolipider. Hyperlipidemi er en vesentlig risikofaktor for å utvikle aterosklerose og hjertesykdom. I følge Nasjonale retningslinjer for primærforebygging av hjerte- og karsykdommer varierer risikoen knyttet til hyperlipidemi kontinuerlig med lipidverdiene avhengig av alder og kjønn, så det er av den grunn ikke hensiktsmessig med absolutte grenser for optimalt eller skadelig lipidnivå [16]. Likevel kan man anse et tilfredsstillende lipidnivå i primærforebygging dersom:

- Totalkolesterol  $< 5,0$  mmol/l og LDL-kolesterol  $< 3,0$  mmol/l
- HDL-kolesterol  $\geq 1,0$  mmol/l (menn) eller  $\geq 1,3$  mmol/l (kvinner)
- Total-/HDL-kolesterol-ratio  $\leq 5$
- Triglyserider  $\leq 1,7$  mmol/l

HDL- og LDL-kolesterol utgjør til sammen total kolesterol. Høye HDL-verdier fører til beskyttelse mot hjerte- og karsykdommer, mens høye LDL-verdier har en ugunstig innvirkning på disse sykdommene [16-18].

### 1.2.2 Årsaker

Dyslipidemi kan ha både primære og sekundære årsaker. De primære årsakene forårsakes av en kombinasjon mellom kosthold og genetikk, selv om diverse miljøfaktorer også kan ha en innvirkning. De sekundære årsakene er en konsekvens av andre tilstander, deriblant diabetes, alkoholmisbruk, lav fysisk aktivitet, kronisk nyresvikt, hypotyreose og leversykdom. Inntak av visse legemidler (Kap. 1.3.3) kan også være bakgrunnen for en slik sekundær årsak [7].

### 1.2.3 Behandling

For personer med hyperlipidemi anbefales først og fremst en ikke-medikamentell behandling med blant annet røykestopp, kostholdsendringer og vektreduksjon. Dersom dette ikke er tilstrekkelig bør medikamentell behandling vurderes som primærprofylakse ved hyperlipidemi. «Nasjonale Retningslinjer for individuell primærforebygging av hjerte- og karsykdommer» ble utgitt i 2009, og inneholder risikotabeller som kan være til hjelp for å avgjøre om en frisk person skal tilbys behandling eller ikke. Disse tabellene skal likevel kun brukes veiledende, og en klinisk vurdering i tillegg er derfor nødvendig. Statiner i høy dose er som regel trygt å bruke, og kan forskrives på blåresept både ved etablert aterosklerotisk sykdom, og dersom det etter en samlet vurdering er en betydelig risiko for å utvikle dette [19].

Blant andre lipidmodifiserende midler finnes også gallesyrebindende resiner, kolesterolabsorpsjonshemmere, omega-3-fettsyrer, nikotinsyrederivater og fibrater, men de to sistnevnte er ikke registrert på det norske markedet per i dag.

## 1.3 Bivirkninger av statiner

I forhold til bivirkninger er statiner generelt en godt tolerert legemiddelgruppe. Bivirkninger som kan forekomme er blant annet nevrologiske sykdommer, gastrointestinale forstyrrelser, levertoksisitet, hudutslett og muskelbivirkninger. De aller fleste pasienter tåler behandlingen svært godt, og alvorlige bivirkninger har vært svært sjeldent rapportert [11]. Likevel viser nyere forskning en andel på 10-12 % av pasientene som utvikler muskelrelaterte bivirkninger [4]. Disse bivirkningene kan føre til myalgi, myositt, myopati og i verste fall rabdomyolyse som kan føre til død (Tab. 1.1) [19]. Det er høye nivåer av laktonformer som er blitt observert i pasienter med statinindusert myotoksisitet [11]. Det er viktig å påpeke at den eventuelle utviklingen av muskeltoksisiteten kommer av en blanding av både legemiddelinteraksjoner,

genetikk, sykdom og samtidig behandling av andre sykdommer, og det er flere risikofaktorer som predisponerer pasienter for slike muskelbivirkninger. Disse inkluderer høy alder, nyre- og/eller leversykdom, diabetes, lavt stoffskifte, svekket allmenntilstand, overdrevent alkoholforbruk og tunge treningsøkter [13]. Blant høydoserte statiner er det vist at simvastatin har gitt et høyere antall tilfeller av myotoksisitet sammenlignet med de andre statinene [1, 11].

**Tabell 1.1 Definisjoner av muskeltoksisitet.** Tabellen er basert på [20].

Tilstand	Definisjon
<i>Myopati</i>	Muskelsvakhet primært i armer og ben
<i>Myalgi</i>	Muskelsmerte og – svakhet uten kreatininstigning
<i>Myositose</i>	Muskelsmerte, – ømhet, og – svakhet med kreatininstigning
<i>Rabdomyolyse</i>	Varig muskelsmerte, – ømhet, – svakhet, og – krampe med kreatininstigning fem til ti ganger over normalen

### 1.3.1 Skjelettmuskulatur

Skjelettmuskulaturen er det største organet i kroppen, utgjør omtrent 45 % av kroppsvekten, og er fordelt på omtrent 600 separate muskler. Hver enkelt myotube dannes etter differensiering og fusjon av embryonale celler, såkalte myoblaster [21]. De ferdigdannede myotubene består derfor av mange cellekjerner liggende etter hverandre, og blir også kalt myofibre. Myofibrene klassifiseres som type I- og type II-fibre, og har ulik evne til utholdenhet og kraftutvikling. Type I-fibrene, også kjent som de røde musklene, er hovedsakelig funnet i de store musklene involvert i kroppsholdningen. Disse fibre utviser oksidativ metabolsk aktivitet med høyt innhold av mitokondrier. Type II-fibrene er derimot kjent som de hvite musklene, henter energi fra glykolysen, og er involvert i bevegelser som krever hurtighet og styrke [20]. Alder, kjønn og hormonstatus er av betydning for sammensetningen av fibertypene, og mengdeforholdet mellom fibre varierer med ulik muskulatur, individ og treningsmengde [22]. Studier utført i rotter viser varierende resultater for hvilken fibertype som påvirkes mest av statiner, men i begge fibertypene er statintoksisitet observert som blant annet forstørrede mitokondrier, aktiverte lysosomer og annen apoptotisk og nekrotisk morfologi [22, 23].

### 1.3.2 Symptomer på myotoksisitet

Typiske symptomer på statinindusert myotoksisitet inkluderer tretthet, muskelsmerte, svak og øm muskulatur, krampe og senebetennelse. Symptomene har en tendens til å forverres ved trening eller oppstart av nye medisiner som kan påvirke statineffekten [24]. I en studie gjort i 2006, den såkalte PRIMO-studien, ble det vist at muskelbivirkningene oppstod i gjennomsnitt en måned etter oppstart med statinbehandling, eller etter en titrering til høyere dose. Likevel viste det seg i en annen undersøkelse at hele 15 % av dem som rapporterte symptomer på muskelbivirkning opplevde symptomene først seks måneder etter behandlingsstart [25].

### 1.3.3 Interaksjoner

Statiner er generelt godt tolerert som monoterapi, men i og med at denne legemiddelgruppen som regel er gitt til pasienter med tanke på langvarig bruk, kan pasientene underveis trenge samtidig behandling med andre legemidler.

På grunn av statinenes store grad av selektivitet for HMG-CoA-reduktase-enzymet, og ingen kjent affinitet for andre enzymer eller reseptorer, er denne legemiddelgruppen lite utsatt for å interagere med andre legemidler med tanke på farmakodynamikken. Ved derimot å se på farmakokinetikken viser statinene store forskjeller innad både når det gjelder halveringstid, systemisk eksponering, maksimal plasmakonsentrasjon, biotilgjengelighet, proteinbinding, lipofilisitet, metabolisme og ekskresjonsveier [13]. Legemidler nevnt i litteraturen som interagerer med statiner, og som kan øke den statininduserte myotoksisiteten, er antihypertensiva, diuretika,  $\beta$ -blokkere, orale kontraseptiva, ciclosporin og kortikosteroider, der alle enten hemmer eller metaboliseres av CYP3A4 [1, 7].

### 1.3.4 Hypoteser for mulige statininduserte muskelbivirkninger

Mekanismen bak den statininduserte myotoksisiteten er ennå ikke fullstendig klarlagt, men fra det kliniske synspunktet hevdes det at bivirkningene er doseavhengige, og risikoen er kjent for å øke når statiner er forskrevet i kombinasjon med andre legemidler som også er myotoksiske ved monoterapi, eller som øker serumkonsentrasjonen av statinene [13]. Under beskrives foreløpige hypoteser for mulige statininduserte muskelbivirkninger.

### Store utslipp av $\text{Ca}^{2+}$

Det har nylig blitt vist at akutte behandlinger med relativt høye doser av simvastatin har trigget store utslipp av  $\text{Ca}^{2+}$  fra sarkoplasmatiske retikulum, noe som er med på å gi tidlig modifisering av den mitokondrielle funksjonen [26]. Det ble vist at simvastatin førte til endringer av  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasen, og denne endringen ble antatt å være årsaken til statinindusert myotoksisitet *in vivo* [26]. Andre studier gjort på skjelettmuskelceller hos rotter og mennesker har bekreftet at mitokondriene og kalsiumhomeostasene er forstyrret etter akutt behandling med simvastatin [27-29]. Uten å ekskludere en effekt av statiner direkte på funksjonen av sarkoplasmatiske retikulum, kan utslipp av  $\text{Ca}^{2+}$  like godt komme av en direkte effekt på mitokondriene [1]. Forandringer på både mitokondriene og  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasen kan føre til apoptose, oksidativt stress og muskelødeleggelser, og kan forklare årsaken til statinindusert myotoksisitet [30, 31].

### Membranforandring

Kolesterol inngår som en del av plasmamembranen, og foreligger i en bestemt ratio med fosfolipider. En reduksjon i kolesterolinnholdet ser ut til å påvirke forskjellige ionekanaler slik som natrium-, kalium- og kloridkanaler, og en påvirkning av membranfluiditeten har blitt påvist i flere pasienter ved statinbruk. Det er kloridkanalen som har blitt koblet til muskeltoksisiteten på grunn av dens kontrollerende rolle i forhold til membranpotensialet og -repolariseringen [31]. Metyl-cyklodekstrin er kompleksdannende, og fjerner kolesterol fra biologiske membraner, og behandling med denne har også vist en påvirkning av den lysosomale membranen i «human hepatocellular liver carcinoma» (HEPG2)-celler [32].

### Co-enzym Q10

En annen hypotese er mangel på co-enzym Q10 (CoQ10), som er et av produktene i HMG-CoA-reduktasesyntesen. CoQ10 er et isoprenoid som spiller en rolle i forhold til elektrontransportkjeden, og en reduksjon av dette kan føre til unormal mitokondriefunksjon. Denne teorien har likevel flere begrensninger. Flere studier gjort på både dyr og mennesker har vist at statinbehandling kan føre til nedregulerte nivåer av CoQ10 i serum, men innholdet i skjelettmuskelcellene har ikke vist seg å synke. I noen tilfeller har det i motsetning vist seg at innholdet av CoQ10 har økt [33]. I en *in vivo*-studie gjort på mennesker induserte cerivastatin celledød på skjelettmuskelcellene, men det ble ikke sett noen sammenheng i forhold til



nedregulert CoQ10. I tillegg ble mevalonolakton tilsatt sammen med cerivastatin, noe som resulterte i en reverserende effekt av celledød, men ingen økning i CoQ10 [34].

### Redusert isoprenylering

Statinene har også blitt hevdet å indusere myotoksisitet ved å hemme isoprenoider som er produkter i HMG-CoA-reduktasesyntesen. Disse isoprenoidene bindes kovalent til proteiner posttranslatorisk ved enten farnesylering eller geranylgeranylering. En reduksjon av disse to funksjonene er hevdet å øke kalsiuminnholdet i cytosol, noe som igjen aktiverer caspase-3 som er involvert i apoptose [33]. Studier gjort på vaskulære glattmuskelceller viser at statinindusert celledød er forhindret ved å tilsette isoprenoider, inkludert FPP og GGPP [35]. Det er også hevdet at årsaken til statinindusert myotoksisitet er inaktivering av Rab-GTPaser på grunn av en reduksjon i dannelsen av GGPP. Det ble observert en induksjon i dannelsen av vakuoler [10] som er antatt å føre til celledød [36]. Rab, og da spesielt isoformen Rab1, er viktig i forhold til intracellulær trafikk og transport fra endoplasmatiske retikulum (ER) til Golgi, og en hemming av denne er vist å være involvert i den statininduserte myotoksisiteten [37].

### Induksjon av apoptose

Apoptose er programmert celledød, og er generelt karakterisert ved morfologiske egenskaper og energiavhengige biokjemiske mekanismer. Enten for mye eller for lite apoptose er en faktor i mange humane tilstander, inkludert nevrodegenererende sykdommer, iskemisk skade, auto-immune sykdommer og i flere typer kreft [38]. I tillegg til at statiner kan indusere apoptose i kreftceller er det vist at statiner også kan føre til apoptose i glatte muskelceller, hjertemyocytter, pericytter (spesialiserte glatte muskelceller), og i revmatoid synovialceller (celler i leddslimhinnen) [38, 39]. Statinindusert apoptose i kreftceller kan sees på som en pleiotrop effekt ved å forhindre eller hemme utviklingen av kreft [40], men den samme induseringen i friske skjelettmuskelceller kan derimot føre til muskelbivirkninger, noe som tidligere nevnt er en mulig bivirkning hos statinbrukere [29, 34, 41, 42].

Det er blitt vist *in vitro* at statiner doseavhengig kan indusere apoptose i myoblaster, myotuber og i primære humane skjelettmuskelceller [29, 34, 41, 42]. Resultatene fra disse studiene tilsier at statinindusert apoptose i skjelettmuskelceller kan komme av modifiserte mitokondrier på grunn av en økning av aktiv initiatorcaspase-9 og effektorcaspase-3 [29, 34].

Sacher et al. viste at Bax translokerte til mitokondriene ved behandling med statiner, noe som kan føre til økt permeabilitet og frigjøring av cytokrom C, et proapoptotisk protein [29, 43]. Tilsetning av mevalonolakton hemmet statinindusert apoptose og aktivering av caspase-3 [29].

## 1.4 Cysteinproteaser

Proteaser deles inn i aspartat-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin- og treoninproteaser, basert på deres katalytiske mekanismer. Dette er proteolytiske enzymer som spalter peptidbindinger ved hjelp av hydrolyse. Proteasene er enten eksopeptidaser som spalter substratet i den terminale enden av polypeptidkjeden, eller endopeptidaser som spalter peptidbindingene internt i proteinet.

I 1920 ble begrepet cathepsiner introdusert, og beskrives som lysosomale proteolytiske enzymer uavhengig av hvilken proteaseklasse de tilhører. I løpet av de siste årene har det blitt vist at cathepsinene kan frigjøres fra lysosomene og videre ut i cytoplasma hvor de igjen spalter substrater under visse forhold [44]. Inne i lysosomene er cathepsinene aktive, og translokering til cytosol medfører et gradvis tap av aktivitet på grunn av nøytral pH [45]. Cysteincathepsinene er de best karakteriserte, og er papain-liknende enzymer tilhørende C1-familien. Spesifisiteten for substrater er noe lavere sammenlignet med caspasene [44, 45]. Opprinnelig var cysteincathepsinene antatt å delta kun i terminal nedbrytning av proteiner under nekrotisk celledød og autofagi, i tillegg til å katalysere spaltningen av proteinene (proteolysen). I dag er det bevist at de også inngår i en rekke andre viktige prosesser, deriblant benresorpsjon, aktivering av prohormoner, og prosessering av antigen for presentering til klasse II «major histocompatibility complex» (MHC) [46, 47].

### 1.4.1 Cathepsin B og L

Høye nivåer av cathepsin B og L er uttrykt i blant annet nyrer, lever, milt og placenta. Alle disse er vev med høy grad av proteinomsetting. Tilstedeværelsen er i tillegg demonstrert i humane skjelettmuskelceller, selv om skjelettmuskel har liten grad av proteinomsetting [48]. Både cathepsin B og L syntetiseres som preproenzymer, modifiseres til zymogener, og undergår autokatalyse og videre modifisering mediert av andre proteaser. Zymogenet for cathepsin B (procathepsin B) har en molekylvekt på 40 kDa, og de to aktive formene er enten enkeltkjedet med en molekylvekt på 29 kDa, eller tokjedet med en molekylvekt på 25 kDa.

Zymogenet for cathepsin L (procathepsin L) har en molekylvekt på 39 kDa, og de to aktive formene er enkeltkjedet med molekylvekt på 31 kDa, og dobbeltkjedet med en molekylvekt på 24 kDa [48-50].

Cathepsin B er både en endo- og eksopeptidase, mens cathepsin L kun er en endopeptidase. Begge cathepsinene er likevel lysosomale proteaser fra cysteinproteasefamilien [48, 50]. Den proteolytiske prosessen som omdanner procathepsiner til aktive proteaser foregår enten i lysosomer eller i sene endosomer [48]. Cathepsin B og L er optimalt aktive i surt miljø, og mest ustabile i nøytralt miljø, der cathepsin L er den mest ustabile [50]. Utenfor lysosomene kan det relativt raskt skje en inaktivering av cathepsinene på grunn av nøytral pH [51].

### 1.4.2 Legumain

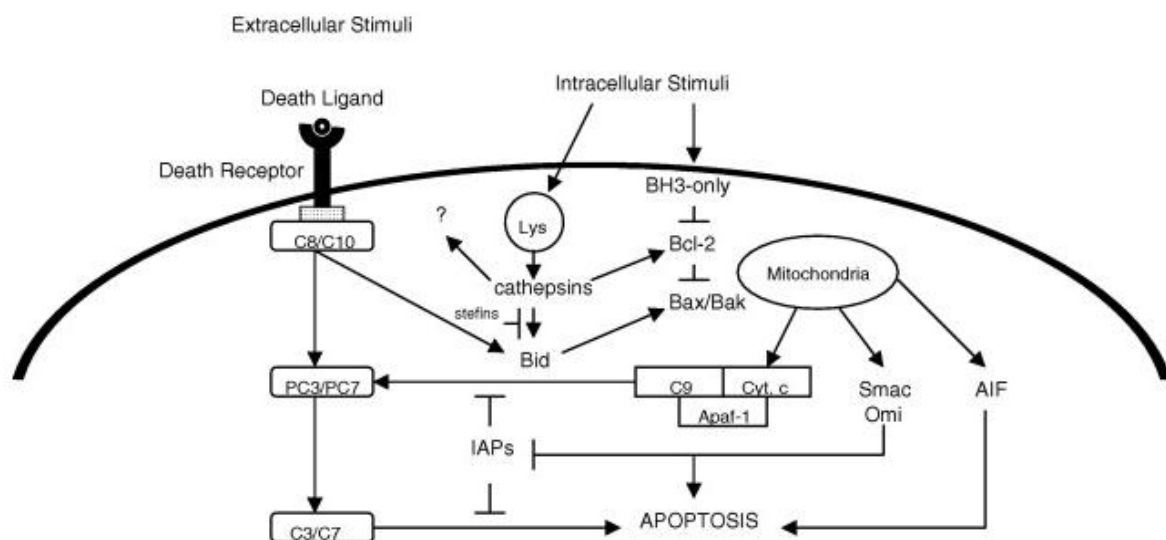
Legumain, også kalt asparaginy endopeptidase (AEP), har fullstendig substratspesifisitet for peptidbindinger karboksyterminalt for asparagin, og er i hovedsak lokalisert i lysosomer/sene endosomer [52, 53]. Dette enzymet har i den senere tid også blitt lokalisert ekstracellulært i mikromiljøet blant tumorceller, og blitt assosiert med cellemembranen og matriks [53]. Helt nye studier av kolorektalkreft viser imidlertid funn av legumain også i cellekjernen [54]. Legumain tilhører cysteinproteasene, og har strukturlikheter med caspasene som er involvert i apoptose [55]. Caspasene tilhører C14-familien, og er hovedsakelig lokalisert i cellenes cytoplasma. De har, i likhet med legumain, spesifisitet for en spesifikk aminosyre (aspartat) i P1-posisjon på substratet [44].

Antiapoptotisk effekt er observert i tumorer, der overuttrykk av legumain viser seg å beskytte cellene mot apoptose [56, 57]. Studier fra både *in vivo* og *in vitro* tilsier at legumain deltar i aktiveringen av cathepsinene B, H, L og pro-(matriksmetalloproteinase-2) (proMMP-2) [58, 59]. Den lysosomale proteasen legumain ble først karakterisert i mammalske celler i 1997 [52], og er vist å forekomme i alle vev, men i størst grad i nyrer og placenta [60]. Legumain syntetiseres som et preproenzym, og vil under transporten til lysosomene modifiseres til et inaktivt zymogen (proenzym) med en molekylvekt på 56 kDa [61]. Aktiveringen av prolegumain er pH-avhengig, og ved pH < 5,5 vil enzymet på 56 kDa bli spaltet på den C-terminale enden, og en intermediær form av legumain på 47 kDa dannes. En videre senkning i pH fører til avspaltning av den N-terminale enden i tillegg, som fører til en annen intermediær form på 46 kDa [61, 62]. *In vivo* ble det imidlertid vist nok en omdannelse fra denne sistnevnte intermediære formen til 36 kDa modent legumain [62], og nylig har det blitt vist at

denne omdannelsen til 36 kDa krever  $\text{pH} \leq 4.0$  for full aktivering [59]. Modningsprosessen er delvis autokatalytisk, men er samtidig avhengig av andre proteolytiske enzymer. Den nøyaktige aktiveringsprosessen er ennå ikke fullstendig klarert [61]. Tidligere studier gjort med statiner har også vist en nedregulering av legumain mRNA i monocytter/makrofager isolert fra pasienter behandlet med atorvastatin [63].

### 1.4.3 Lysosomer og cathepsiner i forhold til apoptose

Lysosomer er utformet som membranbundne vesikler, og inneholder høye konsentrasjoner av forskjellige sure hydrolaser, en gruppe enzymer som spalter organiske forbindelser under opptak av vann. Denne prosessen betegnes som hydrolyse. Lysosomale hydrolaser omfatter proteaser, glykosidaser, lipaser, nukleaser og fosfataser [48].



**Figur 1.3 Signaler av proteasene involvert i apoptose.** Apoptose kan trigges enten via dødsreseptorsignalveien eller den mitokondrielle signalveien. Spesifikk ligandbinding til dødsreseptorer fører til aktivering av caspase-8 og/eller -10 (C8/C10) som igjen fører til aktivering av caspase-3 og eller -7 (C3/C7) og påfølgende apoptose. På grunn av intracellulært stress blir cathepsiner frigjort fra lysosomene (Lys) til cytosol på grunn av permeabilisering av membranen. I cytosol blir proapoptotiske molekyler som Bid eller inaktive anti-apoptotiske Bcl-2-proteiner aktivert, og fører dermed til mitokondriell påvirkning via en mekanisme med Bak og/eller Bax involvert. Mitokondriene deltar i prosessen ved å frigjøre cytokrom C (Cyt. C) og andre apoptotiske proteiner. Figuren er hentet fra [45].

Forskjellige cysteinproteaser har begynt å ta plass i rekken blant årsakene til apoptose. Under fysiologiske forhold har cysteincathepsinene intralysosomal lokalisasjon, og etter gitte signaler frigjøres de fra lysosomene til cytoplasma. Årsaken til denne frigjøringen er

påvirkning av den lysosomale membranpermeabiliteten. Bakgrunnen for cathepsin-regulert apoptose er deres aktivering av blant annet caspasene, og frigjøringen av pro-apoptotiske faktorer fra mitokondriene [44]. En illustrasjon av de forskjellige apoptose-mekanismene er vist i figur 1.3.

Ved å sammenligne caspaser og cysteinecathepsiner i forhold til apoptose er det noen ulikheter å merke seg. Selv om begge er cysteinproteaser, har caspasene en særlig spesifisitet for Asp i P1-posisjon, mens cathepsinene har en bredere spesifisitet. Caspasene trenger en aktivering fra dødsreseptoren før de aktiveres, mens cathepsinene allerede er aktive når de frigjøres fra lysosomene og ut til cytosol. I tillegg er caspasene tilrettelagt for å tåle det pH-nøytrale miljøet i cytosol, mens cathepsinene har vist seg å være mest aktive i surt miljø [45, 64].

## 1.5 Mål for oppgaven

I fjorårets masteroppgave av Linn Løkken Jacobsen [65] ble legumain for første gang detektert i primære humane skjelettmuskelceller både i myoblaster, og i ferdig differensierte myotuber. Det ble funnet sammenhenger mellom simvastatinbehandling og nedsatt legumainaktivitet, og det er av den grunn ønskelig å studere mekanismer knyttet til statinindusert myotoksisitet videre ved å undersøke:

- Om simvastatin påvirker legumain- og cathepsin B-aktivitet i primære humane myotuber ved simvastatinbehandling
- Ekspresjon (mRNA og protein) av legumain, cathepsin B og L ved simvastatinbehandling i humane myotuber
- Hvor legumain, cathepsin B og L er lokalisert i primære humane myotuber, og om simvastatin påvirker denne lokalisasjonen
- Morfologiske endringer av myotubene ved simvastatinbehandling
- Samtidig behandling med simvastatin og mevalonolakton, farnesylpyrofosfat eller geranylgeranylpyrofosfat, for å se om simvastatineffekten er knyttet til hemmingen av HMG-CoA-reduktase

## 2 Materialer og metode

### 2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I), føtalt kalveserum (FCS), penicillin-streptomycin (1000 IE/10 mg/ml), Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B), NuPAGE® Antioxidant, NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x), NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x), NuPAGE Bis-Tris 4–12 % geler, Novex® ELISA kit, 25xdNTP mix og primere for legumain, cathepsin B og L, 36B4 og GAPDH ble kjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Insulin Actarapid® Penfil ble innkjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). Ultrose G ble anskaffet fra BioSerpa, Process Division of CIPHERGEN Biosystems Inc (Paris, Frankrike). Ekstracellulær matriks (ECM), dimetylsulfoksid (DMSO), CHAPS, triton X-100, bovint serumalbumin (BSA), dietylpyrokarbonat (DEPC), Tris (base), simvastatin, mevalonolakton, geranylgeranylpyrofosfat, farnesylpyrofosfat, Ponceau-løsning og ditiotreitol (DTT) ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Corning® 6 Well Cell Culture Cluster 6-brønnersbrett, coatede 6- og 96-brønnersbrett og 25 cm<sup>2</sup> flasker Corning®CELLbind Surface var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). Natriumdihydrogenfosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), natriumklorid (NaCl), metanol (CH<sub>3</sub>OH), aceton (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) og tryptanblått ble anskaffet fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate, Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, Tween® 20, goat anti-rabbit IgG-HRP og goat anti-mouse IgG-HRP ble kjøpt fra Biorad Laboratories Inc. (København, Danmark). Cytoslides (nr. 154534), SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate og Restore™ Western Blot Stripping Buffer ble anskaffet fra Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA). Z-Ala-Ala-Asn-AMC ble kjøpt fra Department of Biochemistry, University of Cambridge (Bachem, UK), mens Z-Arg-Arg-AMC ble anskaffet fra Bachem (Bubendorf, Sveits). Fettfri tørrmelk ble skaffet fra Normilk AS (Levanger, Norge). Goat anti-human polyclonal antibody to legumain, goat anti-human antibody to cathepsin B, goat anti-human polyclonal antibody to cathepsin L og mouse anti-human monoclonal antibody to arylsulfatase B ble anskaffet fra R&D Systems (Abingdon, UK). Rabbit anti-goat IgG (H+L)-HRP kom fra DAKO (Glostrup, Danmark), mens mouse anti-human α-tubulin ble anskaffet fra Calbiochem (San Diego, CA, USA). Mouse anti-human GAPDH og mouse anti-human LAMP2 ble kjøpt fra Santa Cruz (Heidelberg, Tyskland). Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Isoplate® 96-brønnersbrett var fra Wallac OY (Turku, Finland). SYBR green, MicroAmp® Optical Reaction Plate og High-Capacity cDNA Revers Transcription Kit ble kjøpt fra Applied Biosystems (Warrington, UK). Qproteome Cell Compartment Kit ble anskaffet fra Qiagen (Hilden, Tyskland). Øvrige reagenser brukt i denne oppgaven var av analytisk kvalitet.

## 2.2 Donorkarakteristika

I celleforsøkene ble det benyttet primære humane skjelettmuskelceller isolert fra muskelbiopsier tatt fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra friske frivillige donorer. De respektive muskeldonorene er navngitt LD-donorer (levende donorer, tabell 2.1)

**Tabell 2.1 Donorkarakteristika av LD-donorer.**

ID	Alder (år)	Kjønn (M/K)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)
LD 13	53	M	27,7	2,8	0,6	3,0
LD 14	63	M	25,5	3,2	1,9	1,1
LD 15	55	K	29,1	3,0	1,6	1,1
LD 22	40	M	28,7	4,4	1,1	1,5
LD 24	70	K	24,2	3,8	2,5	0,6
LD 30	36	M	26,2	3,7	1,4	0,9
LD 35	37	K	19,1	2,4	1,3	1,6

## 2.3 Celledyrking

Skjelettmuskelceller isolert fra *M. obliquus internus abdominis* fra friske levende donorer ble dyrket i henhold til prosedyren utarbeidet av Gaster et al. [66].

### 2.3.1 Utsåing

Nedfrosne ampuller med celler tilsatt dimetylsulfoksid (10 % DMSO) ble raskt tint på vannbad, og cellesuspensjonen ble deretter overført til et 50 ml sentrifugerør. For å fortynne

effekten av cytotoksisk DMSO ble 5 ml utsåingsmedium (Vedlegg 1.1) tilsatt dråpevis, og fortynningen sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten ble deretter sugd av, og pelleten resuspendert i 1 ml nytt utsåingsmedium. Celletettheten ble bestemt ved å blande cellesuspensjonen og 0,4 % tryptanblått 1:1 med 10 µl av hver, og avlest i en automatisk celledetektor (Countess<sup>TM</sup>) for å beregne riktig antall celler per brønn eller flaske. Forsøkene til subcellulær fraksjonering og real-time-PCR ble sådd ut med 4 ml à omtrent 300 000 celler til allerede overflatebehandlede 25 cm<sup>2</sup> flasker (Corning ®CELLbind Surface). Til forsøkene brukt til enzymaktivitetsmålinger og immunblotting ble det sådd ut 2 ml à omtrent 75 000 celler per brønn i ubehandlede og ferdig overflatebehandlede 6-brønnersbrett (Corning ®CELLbind Surface). Til immunfluorescens (IF)-fargingsforsøkene ble ubehandlede 8-brønnersbrett (Lab-Tek®II Chamber Slide<sup>TM</sup>) benyttet, og mellom 25 000 og 30 000 celler sådd ut i hver brønn. Ubehandlete brett og flasker ble overflatebehandlet med ekstracellulær matrix (ECM) (Vedlegg 1.2) på forhånd, og ble etter utsåing inkubert sammen med de ferdig overflatebehandlede brettene og flaskene ved 5 % CO<sub>2</sub> og 37 °C.

### **2.3.2 Proliferasjon og differensiering av myoblaster til myotuber**

Utsåingsmediet ble byttet ut med proliferasjonsmedium (Vedlegg 1.3) etter 24 timer. Dette mediet ble skiftet hver 2.-3. dag fram til 70-80 % konfluens av cellene. Differensieringsmedium (Vedlegg 1.4) ble da tilsatt, og tidspunktet ble kalt tilsettingsdag 0. Dette mediet ble videre skiftet hver 2.-3. dag fram til differensieringsdag 5, da cellene til slutt ble stimulert med simvastatin med og uten ML, FPP eller GGPP.

### **2.3.3 Stimulering av myotuber**

Stockløsninger med 100 mM SL, 2 M ML, 6 mM FPP og 6 mM GGPP i 100 % DMSO ble fortynnet i differensieringsmedium til en DMSO-konsentrasjonen på 0,1 %. Kontrollcellene ble også behandlet med differensieringsmedium tilsatt 0,1 % DMSO (kontroll), slik at løsningsmediet ble likt for både kontrollen og stockløsningene. Til forsøkene brukt til enzymaktivitetsmålinger og immunblotting ble cellene tilsatt 30 µM SL med og uten 1 mM og 50 µM ML, 3 µM FPP eller 3 µM GGPP. Til forsøk for subcellulær fraksjonering ble cellene kun behandlet med og uten 30 µM SL. Denne behandlingen gjaldt også for cellene til IF-fargingen. Cellene til PCR-forsøkene ble behandlet med eller uten 5 eller 30 µM SL, og 30 µM SL sammen med 1 mM ML.



### **2.3.4 Høsting av myotuber**

Alle cellene ble høstet på dag 7 av differensieringsperioden. Under følger beskrivelser for høsting til enzymaktivitetsmåling og immunblotting, RT-PCR, og subcellulær fraksjonering. Kondisjonert medium ble for alle disse forsøkene først sugd av og overført til 15 ml-rør før sentrifugering ved 1000 g og 4 °C i 10 minutter, og frosset ned fram til analyse med ELISA. Dag 7 av IF-forsøkene står beskrevet i kapittel 2.10.

#### **Enzymaktivitet og immunblott**

Cellene til enzymaktivitetsmålinger og immunblotting ble først vasket to ganger med PBS i destillert vann, og deretter lysert med 500 µl lysisbuffer (Vedlegg 1.6). Det ble brukt en skrape for å løsne alle cellene. De lyserte cellene ble sentrifugert ved 10 000 g og 4 °C i 10 minutter før supernatanten ble overført til nye rør, og deretter frysetint tre ganger ved henholdsvis -70 °C og romtemperatur.

#### **RT-PCR**

Cellene til RT-PCR-forsøkene ble vasket to ganger med PBS (Vedlegg 1.5) i DEPC-H<sub>2</sub>O før de ble lysert med 300 µl lysisbuffer fra Agilent Technologies tilsatt 0,5 ml β-mekarptoetanol (β-ME). Disse cellelysatene ble også løst fra overflaten og sentrifugert på samme måte som beskrevet for enzymaktivitetsmålinger og immunblotting, men ble frosset ned ved -70 °C fram til analyse for å unngå nedbrytning av mRNA.

#### **Subcellulær fraksjonering**

Cellene til subcellulær fraksjonering ble først vasket to ganger med PBS i destillert vann, og deretter tilsatt 2 ml trypsin for å løsne cellene fra overflaten. Videre ble fraksjoneringsprotokollen fra Qiagen fulgt ved bruk av Qproteome Cell Compartment Kit. Fraksjonene fra alle forsøkene ble oppbevart ved -70 °C.

## **2.4 Totalproteinmåling**

For å beregne mengden av totalprotein i lysatene, ble det benyttet en prosedyre beskrevet av Bradford [67]. Acetonfelling ble gjort i forhold til prosedyren beskrevet i Qproteome Cell Compartment Handbook for både oppkonsentrering og avsalting av proteinene. Avsaltingen var nødvendig for å hindre interaksjon med kvantifiseringen av unødvendige komponenter i

proteinene. Fire deler iskald aceton ble tilsatt én del proteinfraksjon, og inkubert i 15 minutter på is. Deretter ble suspensjonen sentrifugert i 10 minutter ved 12000 g og 4 °C før supernatanten ble fjernet, og pelletten fikk lufttørke. Videre ble fraksjonene resuspendert i lysisbuffer, og var da klare for kvantifisering. Totalproteinmålingen var nødvendig for senere å kunne beregne riktig mengde cellelysat til oppkonsentrering og applisering på gel ved immunblotting, og i tillegg kunne måle enzymaktiviteten i forhold til proteininnholdet.

Både standarder og prøver, henholdsvis som duplikater og triplikater, ble pipetert ut med 10 µl på en Nunc 96-brønners mikrotitrerplate. Standardene bestod av bovint serumalbumin fortynnet i lysisbuffer i konsentrasjonene 0 til 400 µg/ml, og en standardkurve ble benyttet til å beregne proteinkonsentrasjonene i cellelysaten. Totalproteinmengden ble detektert med 200 µl fortynnet fargereagens (Vedlegg 2.1) i hver brønn inneholdende standard og prøve. Prinsippet for proteindeteksjonen er at dette reagenset inneholder et fargestoff (Coomassie® Brilliant Blue G-250) som i surt miljø binder seg til proteiner, og dermed endrer farge fra rødbrunt til blått. Dette fører til en endring av absorpsjonsmaksimum fra 465 til 595 nm, og det er ved den sistnevnte bølgelengden absorpsjonen måles etter 5 minutter i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter).

## 2.5 Enzymaktivitetsmålinger

Enzymaktivitetene ble målt etter to forskjellige prosedyrer basert på hvert sitt enzym, og framstilt som økning i fluorescens per sekund per protein. For legumain ble enzymaktiviteten beregnet etter en prosedyre beskrevet av Johansen et al. [68]. Z-Ala-Ala-Asn-AMC (10 µM brønnkonsentrasjon) ble brukt som spesifikt peptidsubstrat for dette enzymet.

En prosedyre beskrevet av Barrett et al. [69] ble brukt for å måle aktiviteten for cathepsin B, og her ble det spesifikke peptidsubstratet Z-Arg-Arg-AMC (20 µM brønnkonsentrasjon) tatt i bruk.

For å måle enzymaktiviteten må cysteinproteasene først aktiveres, og til dette formålet ble det i denne oppgaven brukt DTT (ditiotreititol), et syntetisk reduksjonsmiddel [52]. Det ble også brukt peptidsubstrater med «leaving»-gruppen AMC (7-amino-4-metylkumarin). AMC eksiteres ved 360 nm, og avgir kraftig fluorescens ved 460 nm emisjon. Triplikater av 20 µl cellelysat og lysisbuffer (blindprøve) ble tilsatt en sort Costar 96-brønners mikrotitrerplate før platen ble satt inn i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter). En

assaybuffer for hver protease inneholdende DTT (Vedlegg 3.1 og 3.3) ble ved hjelp av en injektor tilsatt med 100  $\mu\text{l}$  i hver brønn før platen ble ristet i 10 sekunder, og deretter inkubert ved 30 °C i 10 minutter. Umiddelbart før målingen startet ble 50  $\mu\text{l}$  peptidsubstratløsning (Vedlegg 3.2 og 3.4) tilsatt, og fluorescens ble målt 10 ganger. For legumain ble hver måling målt med 5 minutters mellomrom, mens for cathepsin B ble det kun brukt 1 minutt mellom målingene. De enzymatiske reaksjonene er temperaturavhengige, så temperaturen ble derfor holdt konstant på 30 °C. Fluorescensøkningen ( $\Delta F/s$ ) ble til slutt delt på totalprotein i prøven, angitt som enzymaktivitet/ $\mu\text{g}$  totalprotein.

## 2.6 Immunblotting (Westernblotting)

Westernblotting er en metode brukt etter gelelektroforese for å detektere og kvantifisere proteiner ved hjelp av antistoffer. Gelelektroforesen separerer proteinene med hensyn på molekylvekt.

### 2.6.1 Elektroforese

En polyakrylamid-gel (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel) ble plassert i et gelkar med elektroforesebuffer (Vedlegg 4.1), og bufferen mellom gelene ble tilsatt 500  $\mu\text{l}$  antioksidant. Kammene ble fjernet, og 10  $\mu\text{g}$  totalprotein fra prøve og kontroll ble tilsatt hver sin brønn. Proteinene ble først oppkonsentrert ved hjelp av acetonefelling med 80 % aceton før hver proteinpellet ble resuspendert i destillert vann, DTT og litium dodecylsulfat (LDS)-prøvebuffer (Vedlegg 4.2) med påfølgende varmebad ved 70 °C i 10 minutter. Bufferen og oppvarmingen gjør at proteinene denaturerer, mens DTT bryter disulfidbindingene i proteinene som bidrar til den tredimensjonale strukturen. Det ble pipettert 15  $\mu\text{l}$  prøve og 5  $\mu\text{l}$  proteinstandard (Precision Plus Protein™) i hver sin brønn på gelen. Elektroforesen kjørte ved 200 V i 50 minutter.

### 2.6.2 Immunblotting

Etter elektroforesen ble gelene overført til en blottemaskin. En blottebuffer (Vedlegg 4.3) ble brukt til å fukte filterpapirene og membranene, og strømtilførselen ble justert til 32 mA per gel i halvannen time. Ferdig blott ble farget i Ponceau for å få et visuelt bilde av proteinmengden som ble farget rødt. Videre ble membranene vasket med T-TBS (Vedlegg 4.4

og 4.5), blokkert med Blotto (Vedlegg 4.6) i 1 time, og deretter tilsatt primært antistoff fortynnet i Blotto over natt på kjølerom. Dagen etter ble membranene vasket 5x10-15 minutter med T-TBS, tilsatt tilhørende sekundært antistoff fortynnet i Blotto i 45-60 minutter, og igjen vasket 5x10-15 minutter med T-TBS. Membranene ble etter dette lagt 5 minutter i fremkallervæske (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) før fremkalling.

**Tabell 2.2 Antistoffer benyttet ved immunblotting.** GAPDH; glyceraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase, LAMP2; lysosomal-assosiert membranprotein-2

Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
<i>Legumain</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to legumain	1:1000	Rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP	1:5000
<i>Cathepsin B</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to cathepsin B	1:5000	Rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP	1:5000
<i>Cathepsin L</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to cathepsin L	1:5000	Rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP	1:5000
<i>GAPDH</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to GAPDH	1:10 000	Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500
<i>LAMP2</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to LAMP2	1:500	Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500
<i><math>\alpha</math>-tubulin</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to $\alpha$ -tubulin	1:5000	Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500
<i>Lamin B</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to lamin B	1:1000	Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500
<i>Arylsulfatase B</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to arylsulfatase B	1:500	Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500

### 2.6.3 Reblotting

Etter fremkallingen av legumainmembranene ble de vasket med T-TBS, strippet med stripebuffer (vedlegg 4.7), vasket igjen med T-TBS, og deretter blokket i Blotto i 1 time før tilsetning av nye primære og sekundære antistoffer (Tabell 2.2) etter vanlig Western-

prosedyre. Med programmet Image Lab<sup>TM</sup> ble båndintensiteten kvantifisert, og protease-ekspresjonen korrigert for med «housekeeping»-kontrollen.

## 2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA er en metode brukt for detektering og kvantifisering av proteiner ved bruk av spesifikke antistoffer, og metoden ble brukt for å undersøke eventuell mengde av legumain utskilt i det kondisjonerte cellemediet. Totalmengden av både aktiv form og proform av legumain ble detektert ved hjelp av ELISA-kit (Human Total Legumain DuoSet), og leverandørens protokoll ble fulgt. En 96-brønners mikrotitrerplate ble overflatebehandlet med primærantistoff («Capture») og inkubert ved romtemperatur over natt. Det spesifikke primærantistoffet vil binde legumain som befinner seg i det kondisjonerte mediet. Dagen etter ble brønnene vasket med 400 µl vaskebuffer (Vedlegg 5.1), tilsatt 300 µl fortynningsreagens (Vedlegg 5.2) for deretter å bli vasket på nytt. Deretter ble prøve og standard fortynnet i fortynningsreagens, og tilsatt med 100 µl på mikrotitrerplaten. Etter inkubering i 2 timer og påfølgende vasking, ble sekundærantistoffet fortynnet i fortynningsreagens og tilsatt med 100 µl. Det sekundære antistoffet er konjugert med biotin og binder seg til en annen epitop på legumain. Etter ny inkubering på 2 timer og vasking, ble Streptavidin/HRP (100 µl) tilsatt i hver brønn for å binde seg til biotin på det sekundære antistoffet, og inkubert i 20 minutter. Platen ble deretter vasket for siste gang, og pipettert med 100 µl substratløsning med påfølgende inkubering i 20 minutter. All inkubering foregikk i romtemperatur. Til slutt ble 50 µl stoppløsning (Vedlegg 5.3) tilsatt, før umiddelbar avlesning i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter) ved 450 nm.

## 2.8 Subcellulær fraksjonering

Cellulære fraksjoner, derav cytosol, membraner, kjerne og cytoskjelett, ble selektivt isolert etter den subcellulære fraksjoneringsprosedyren fra Qiagen. Denne metoden ble brukt for å se hvor cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L befant seg i cellene.

Etter trypsinering av cellene (som beskrevet i 2.2.4) ble 5 ml differensieringsmediet tilsatt og cellesuspensjonen overført til rør som ble sentrifugert ved 500 g i 10 minutter ved 4 °C. Etter dette ble pelletten resuspendert i 2 ml iskald PBS (Vedlegg 1.5), og overført til eppendorfrør

som igjen ble sentrifugert ved 500 g og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet, og det siste trinnet ble gjentatt. Fire forskjellige buffere ble blandet etter tabell 2.3.

**Tabell 2.3 Oversikt over buffere brukt ved subcellulær fraksjonering**

	Buffer CE1	Buffer CE2	Buffer CE3	Buffer CE4
Brukt til å isolere proteiner fra:	<i>Cytosol</i>	<i>Membraner</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Cytoskjelett</i>
Volum av buffer:	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
Proteasehemmer (100x):	10 µl	10 µl	5 µl	-

Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml iskald CE1-buffer, og inkubert i 10 minutter ved 4 °C under stadig omrøring. Suspensjonen ble videre sentrifugert ved 1000 g og 4 °C i 10 minutter før supernatanten (cytosolfraksjonen) ble overført til et eget eppendorfrør plassert på is. Cellepelletten ble deretter resuspendert i 1 ml iskald CE2-buffer, og inkubert i 30 minutter ved 4 °C under stadig omrøring. Suspensjonen ble på nytt sentrifugert ved 6000 g og 4 °C i 10 minutter, og supernatanten (membranfraksjonen) ble overført til et eget eppendorfrør på is. Deretter ble cellepelletten resuspendert i destillert vann og benzonasemix (Benzonase® Nuclease) i 15 minutter i romtemperatur, før 500 µl iskald CE3-buffer ble tilsatt og inkubert i 10 minutter ved 4 °C under omrøring. Suspensjonen ble deretter sentrifugert ved 6800 g i 10 minutter før supernatanten (kjernefraksjonen) ble overført til nytt eppendorfrør på is. Pelletten ble til slutt resuspendert i 500 µl CE4-bufferen, og utgjorde cytoskjelett-fraksjonen.

## 2.9 Revers-transkripsjon-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR)

Ved denne metoden ble eventuelle endringer av mRNA-ekspresjonen til ulike cysteinproteaser, derav legumain, cathepsin B og L, studert i humane myotuber ved stimulering med 5 eller 30 µM simvastatin, både med og uten tilsetning av 1 mM mevalonolakton. Det ble brukt et isoleringskit fra Agilent Technologies i denne oppgaven.

### **2.9.1 Isolering og kvantifisering av RNA**

RNA fra hver enkelt prøve ble isolert etter protokoll fra Agilent Technologies (Agilent Technologies Total RNA Isolation Protocol). Kort fortalt ble opptil 600 µl cellelysat sentrifugert gjennom mini-prefiltreringskolonner ved 16 000 g i 3 minutter. Deretter ble en lik mengde 70 % etanol tilsatt og blandet, og inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Opptil 600 µl av denne løsningen ble tilsatt mini-isoleringskolonner og sentrifugert i 30 sekunder ved 16 000 g før den filtrerte væsken ble kastet. Ferdiglaget vaskeløsning (Agilent Technologies Wash Solution) ble tilsatt med 500 µl til hver mini-isolasjonskolonne, og sentrifugert i nye 30 sekunder ved 16 000 g. Den filtrerte væsken ble kastet, og den samme vaskingen ble gjentatt. Helt til slutt ble kolonnene sentrifugert ved 16 000 g i 2 minutter for å fjerne de siste dråpene i filteret. Renset RNA ble deretter eluert ved å tilsette 15 µl nukleasefritt vann før sentrifugering ved 16 000 g i 2 minutter. Kvantifiseringen av total RNA ble gjennomført ved å plassere 2 µl på en metallplate, og konsentrasjonen i ng/µl ble målt direkte ved hjelp av picoDROP.

### **2.9.2 Komplementær DNA (cDNA)-syntese**

Komplementær DNA (cDNA)-syntesen ble utført etter protokoll fra Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 Reactions). Beregnet utfra kvantifiseringen av total-RNA ble 0,5 eller 2 µg av prøvene fortynnet med DEPC-H<sub>2</sub>O til totalt 13,2 µl. Reaksjonsmix (6,8 µl; Vedlegg 6.1) ble plassert i hvert mini-eppendorfrør (MicroAmp®) før de fortynnede RNA-prøvene ble tilsatt. Selve cDNA-syntesen ble utført i ThermalCycler 9600 Perkin-Elmer. Prøvene, sammen med blank kontroll (DEPC-H<sub>2</sub>O) og kontrollprøve uten revers transkriptase, ble først behandlet ved 25 °C i 10 minutter (heksamer i templatpriming). Deretter ble prøvene behandlet ved 37 °C i 80 minutter der revers transkripsjon fant sted og cDNA ble syntetisert, og til slutt ved 85 °C i 5 sekunder for å inaktivere enzymet.

### **2.9.3 Real-time-PCR**

Innhold av cDNA i de forskjellige prøvene ble beregnet ved å lage en standardkurve inneholdende lik mengde cDNA fra de ulike prøvene og fortynne 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O. Denne konsentrasjonen ble satt til 1000, og ble videre fortynnet med DEPC-H<sub>2</sub>O til konsentrasjonene 500, 250, 125, 62,5 og 31,25. Prøvene for kvantifisering av legumain, cathepsin B og L ble

fortynnet 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O, mens «housekeeping»-kontrollene 36B4 og GAPDH ble fortynnet 1:10 i DEPC-H<sub>2</sub>O. En reaksjonsblanding (Vedlegg 6.2) med spesifikke primere (tabell 2.4) ble tilsatt hver brønn på en MicroAmp® Optical Reaction Plate, før 2,5 µl fortynnet cDNA fra standard og prøve ble tilsatt til slutt. Den ferdigfylte platen ble deretter satt inn i ABI PRISM 7000 Applied Biosystem. Prøvene ble behandlet med 40 sykluser, der hver syklus bestod av en denatureringsfase ved 95 °C i 15 sekunder, en hybridiseringsfase ved 60 °C i 60 sekunder, og til slutt en polymeriseringsfase ved 72 °C. I denatureringsfasen brytes hydrogenbindingene mellom DNA, og vi får dannet ssDNA (enkeltrådet DNA). I hybridiseringsfasen vil to primere feste seg til hver sin ende på den komplementære sekvensen på ssDNAet, og i polymeriseringsfasen syntetiserer DNA-polymerasen cDNA på de to eksisterende DNA-trådene slik at vi igjen får dannet dsDNA (dobbeltrådet DNA). Det er på dette nydannede DNAet det fluorescerende reagenset SYBR Green fester seg, og fluorescensen detekteres etter hver syklus. Den laveste detekterbare fluorescensverdien ble brukt videre i beregningen, og mRNA-verdien ble relatert til «housekeeping»-kontrollene 36B4 og GAPDH. Resultatet ble oppgitt relativt mot kontroll.

**Tabell 2.4 Benyttede primere ved real-time PCR.** F; «forward»-primer, R; «reverse»-primer.

Protein	Gen	Genbanknr.	Primer
Legumain	hLGMN	BC_003061	F 5'-CCGAAAGATGGTGTCTACATTGA-3' R 5'-TTATCCGGCAGGTGGTTCAT-3'
Cathepsin B	hCTSB	L_16510	F 5'-GGCCTTTTCTTGTCCAGAAG-3' R 5'-TTCGATGCACGGAACAATG-3'
Cathepsin L	hCTSL	NP_001903	F 5'-ATGAATCCTACACTCATCCTTGCTGCCTTT-3' R 5'-CCACACTGCTCTCCTCCATCCTTCTT-3'
36B4	h36B4	M_33197	F 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
GAPDH	hGAPDH	J_04038	F 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R 5'-GGCATGGACTGTGGTCATAG-3'

## 2.10 Konfokalmikroskopi

Det ble utført konfokalmikroskopi med hensikt på å visualisere legumain intracellulært i myotuber, og eventuelt finne ut om legumain kolokaliserte med LAMP2/arylsulfatase B. Alle forsøkene ble fotografert i et konfokalmikroskop (Carl Zeiss LSM 710).

Skjelettmuskelcellene ble proliferert og differensiert som beskrevet i kap. 2.2.2, og stimulert med 0,1 % DMSO (kontroll) og 30 µM SL på dag 5 av differensieringsperioden. Myotubene



ble fiksert i 10 minutter med paraformaldehyd (Vedlegg 7.1), før de ble vasket med PBS (Vedlegg 1.5). Deretter ble myotubene permeabilisert med Triton X-100 (Vedlegg 7.2) før ny vask med IF-buffer (Vedlegg 7.3). Etter 1 times blokkering med hesteserum (Vedlegg 7.4) og en påfølgende vask med IF-buffer i 5 minutter, ble 100 µl av de primære antistoffene mot legumain, cathepsin B og L tilsatt sine respektive brønner, og inkubert 1 eller 24 timer i fuktekammer. IF-buffer ble igjen brukt til 3x10 minutters vasking, før det tilhørende sekundære antistoffet ble tilsatt og inkubert i 1-2 timer. Nye primære og sekundære antistoffer ble tilsatt etter samme prosedyre, denne gangen antistoffer mot LAMP2, arylsulfatase B og cystatin E/M, før brettene ble behandlet med 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) for å farge kjernene blå ved konfokalmikroskopi. Alle bildene ble tatt med samme laser- og kamerainnstillinger. Oversikt over de benyttede antistoffene er vist i tabell 2.5.

**Tabell 2.5 Antistoffer brukt ved konfokalmikroskopi**

Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
<i>Legumain</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to legumain	1:100	Donkey anti-goat IgG (H+L) Alexa 488	1:500
<i>Cathepsin B</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to cathepsin B	1:100	Donkey anti-goat IgG (H+L) Alexa 488	1:500
<i>Cathepsin L</i>	Goat anti-human polyclonal antibody to cathepsin L	1:100	Donkey anti-goat IgG (H+L) Alexa 488	1:500
<i>LAMP2</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to LAMP2	1:100 1:50	Rabbit anti-mouse IgG (H+L) Alexa 633 Donkey anti-mouse IgG Alexa 568	1:500 1:200
<i>Arylsulfatase B</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to arylsulfatase B	1:100 1:50	Rabbit anti-mouse IgG (H+L) Alexa 633 Donkey anti-mouse IgG Alexa 568	1:500 1:200
<i>Cystatin E/M</i>	Mouse anti-human monoclonal antibody to cystatin E/M	1:100	Rabbit anti-mouse IgG (H+L) Alexa 633 Donkey anti-mouse IgG Alexa 568	1:500 1:200

## 2.11 Statistiske analyser

Dataene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM), og antall forsøk (n) varierer fra 1-6. De statistiske analysene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism 5 for Windows, og signifikansnivået er definert som  $p < 0,05$ . Paret t-test (Students *t*-test) ble benyttet for å undersøke om endringen i enzymaktivitet, -ekspresjon og mRNA-ekspresjon var statistisk signifikant mellom behandlede og ubehandlede myotuber. Paret t-test ble også benyttet for de kondisjonerte mediene knyttet til ELISA-målingene.

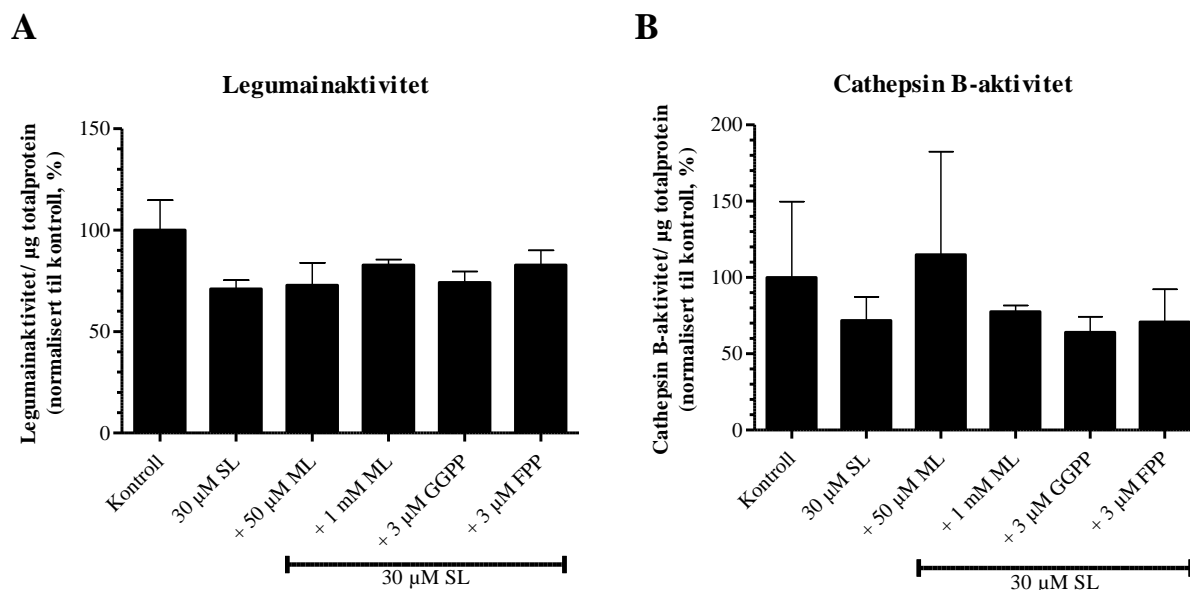
## 3 Resultat

### 3.1 Effekt av simvastatin på legumain- og cathepsin B-aktivitet i myotuber

Det er tidligere vist en nedregulering av legumainaktivitet ved simvastatinbehandling i myotuber [65], og det var derfor ønskelig å undersøke dette nærmere. For å studere aktivitetene til cysteinproteasene legumain og cathepsin B sammen med simvastatinbehandling, ble primære humane myotuber behandlet på dag 5 av differensieringen. Myotubene ble behandlet i 48 t med 30  $\mu\text{M}$  simvastatin med og uten 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML, 3  $\mu\text{M}$  GGPP eller 3  $\mu\text{M}$  FPP. Kontrollen bestod av 0,1 % DMSO, det samme løsningsmiddelet som også ble brukt for tilsetningsstoffene.

Legumain viste en tendens til reduksjon i aktivitet på omtrent 30 % etter behandling med simvastatin alene (Fig. 4.1 A), og simvastatineffekten ble motvirket ved samtidig behandling med 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML. Det ble også observert en tendens til redusert effekt av simvastatin ved samtidig behandling med 3  $\mu\text{M}$  FPP.

For cathepsin B (Fig. 4.1 B) ble det observert en tendens til 20-30 % reduksjon i aktiviteten ved simvastatinbehandling, noe mindre enn for legumain. En tendens til delvis motvirkning av simvastatineffekten ble også observert for denne cysteinproteasen ved samtidig behandling med 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML, men ikke med FPP som ble observert for legumain. Av de 6 donorene som ble studert, var gjennomsnittlig cathepsin B-aktivitet/ $\mu\text{g}$  totalprotein uten behandling av simvastatin på rundt 1400 (+/- 500), mens det for legumainaktivitet/ $\mu\text{g}$  totalprotein var på rundt 11 (+/- 2).



**Figur 4.1 Effekt av simvastatin på aktivitet av legumain (A) og cathepsin B (B) i humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis*.** Myoblaster ble sådd ut, proliferert og differensiert i 6-brønnersbrett. På dag 5 av differensieringsperioden ble cellene behandlet i 48 t med 0,1 % DMSO (kontroll) eller 30 μM simvastatin (SL) med og uten 50 eller 1000 μM mevalonolakton (ML), 3 μM geranylgeranylpyrofosfat (GGPP) eller 3 μM farnesylpyrofosfat (FPP), før de ble høstet i lysisbuffer. Enzymaktiviteten er presentert som gjennomsnitt ± SEM, og normalisert til kontroll. **A.** Legumainaktiviteten ble målt ved å bruke det fluorescerende spesifikke peptidsubstratet Z-Ala-Ala-Asn-AMC (n=6). **B.** Cathepsin B-aktiviteten ble målt med det fluorescerende spesifikke peptidsubstratet Z-Arg-Arg-AMC (n=3).

### 3.2 Ekspresjon av legumain, cathepsin B og cathepsin L i primære humane myotuber

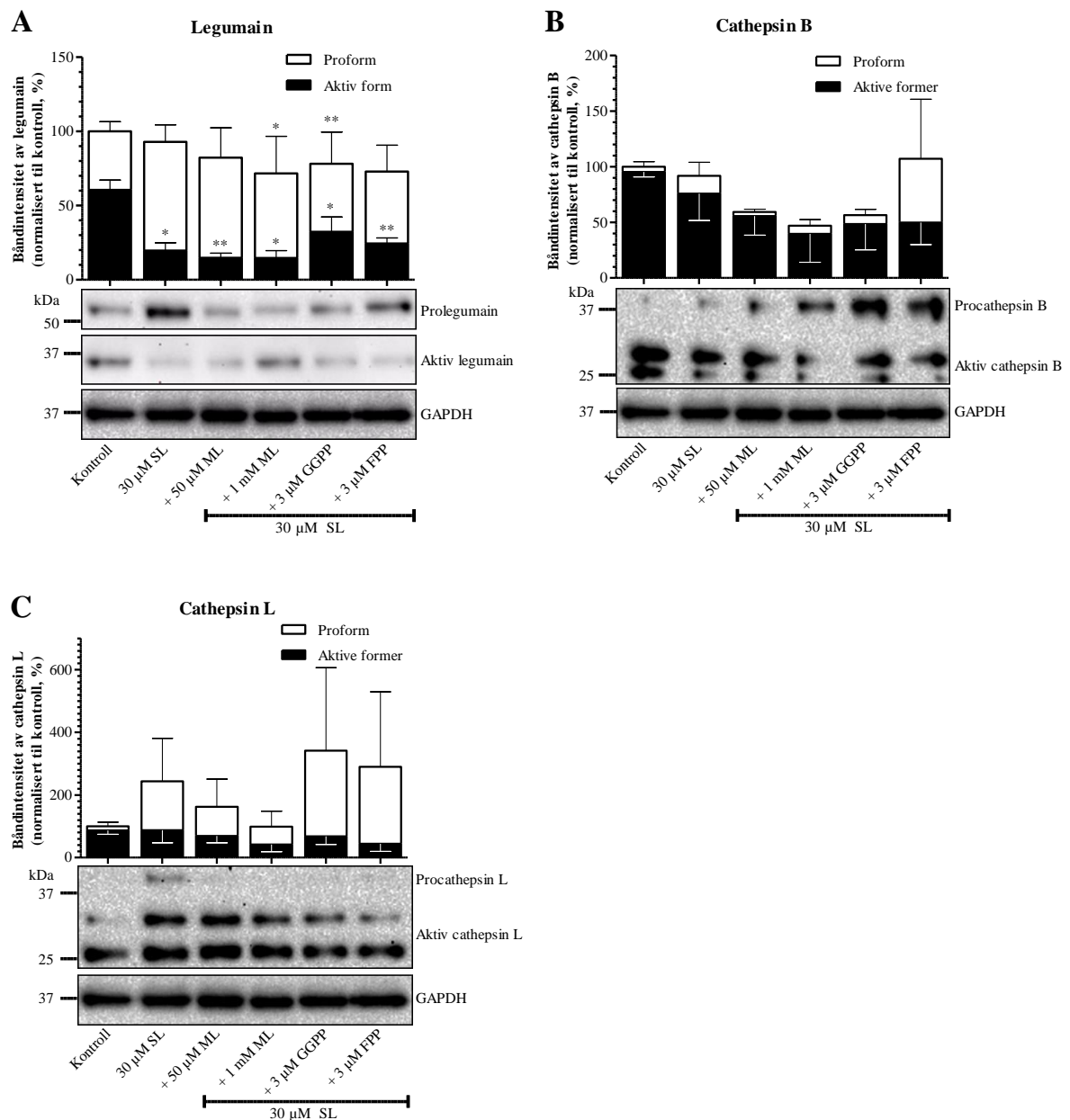
For å undersøke effekten av simvastatin på ekspresjonen av legumain, cathepsin B og L i primære humane skjelettmuskelceller, ble cellene behandlet i 48 timer fra dag 5 av differensieringen med simvastatin med eller uten ML, GGPP eller FPP. Representative immunblott med tilhørende båndintensitetsanalyser er vist i figur 3.2. For å kunne sammenligne effektene fra de forskjellige behandlingene, ble båndintensiteten korrigert i forhold til «housekeeping»-kontrollen GAPDH.

Ubehandlete myotuber uttrykte både proformer og aktive former av legumain, cathepsin B og L, men de to sistnevnte viste størst innhold av proformene. Ved behandling med simvastatin viste legumain en tendens til 60 % reduksjon av aktiv form (36 kDa) og 50 % økning av proformen (56 kDa) (fig. 4.2 A). Reduksjonen av aktiv legumain (36 kDa) ble delvis

forhindret ved samtidig behandling med 3  $\mu\text{M}$  GGPP, mens samtidig behandling med 3  $\mu\text{M}$  FPP, 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML ikke viste noen forhindring av simvastatineffekten.

For cathepsin B viste proformen (40 kDa) nærmest tre gangers økning etter behandling med 30  $\mu\text{M}$  simvastatin, men siden proformen kun var uttrykt i en av donorene er det vanskelig å trekke noen konklusjoner i forhold til dette. Nedgangen av den aktive formen (25 og 30 kDa) var på 20 %, og ingen motvirkende effekt av simvastatin ble observert ved samtidig behandling med 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML, 3  $\mu\text{M}$  GGPP eller 3  $\mu\text{M}$  FPP.

I tillegg uttrykte cellene både procathepsin L (42 kDa) og aktiv cathepsin L (21 og 30 kDa). Ekspresjon av aktive former av cathepsin L ble ikke påvirket av simvastatin (fig. 4.2 C). Proformen ble kun påvist i en av donorene, og det ble sett en tendens til nedgang i uttrykket av proformen i denne donoren etter behandling med simvastatin sammen med 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML, og en økning sammen med 3  $\mu\text{M}$  GGPP eller 3  $\mu\text{M}$  FPP.



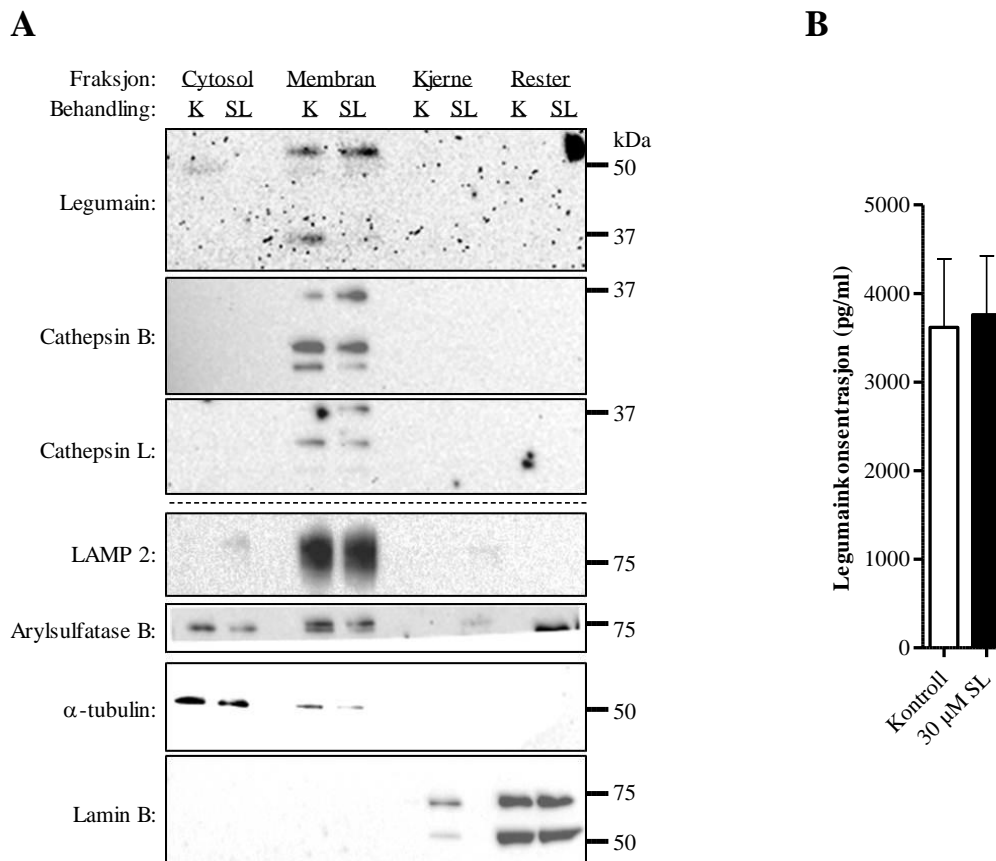
**Figur 4.2** Effekt av simvastatin på ekspresjon av legumain (A), cathepsin B (B) og cathepsin L (C) i humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis*. Myoblaster (ca. 75 000 celler/brønn) ble sådd ut, proliferert og differensiert i 6-brønnersbrett. På dag 5 av differensieringen ble cellene behandlet i 48 t med 0,1 % DMSO (kontroll) eller 30 μM simvastatin (SL) med og uten 50 eller 1000 μM mevalonolaktone (ML), 3 μM geranylgeranylpyrofosfat (GGPP) eller 3 μM farnesylpyrofosfat (FPP), før de ble lysert i lysisbuffer. Panelene i A, B og C viser respektive representative immunblott av cellelysater. Grafene i A, B og C viser båndintensiteten kontrollert for og normalisert til «housekeeping»-kontrollen GAPDH. Hver søyle viser totalmengde protease, aktiv form (sort) og proform (hvitt). Aktive former av cathepsin B (B) og cathepsin L (C) er slått sammen. Legumain (A, n=4-6) er representert som gjennomsnitt ± SEM av både pro- og aktiv form, og normalisert til ubehandlede kontroller. Dataene fra cathepsin B (B, n=1-6) og cathepsin L (C, n=1-6) er representert som gjennomsnitt ± SEM av aktive former. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (paret t-test).

### **3.3 Legumain, cathepsin B og cathepsin L i membranfraksjonen av myotuber**

På grunn av nedgangen i aktivitet og ekspresjon av hovedsakelig legumain i cellelysaten, var det ønskelig å undersøke om simvastatin førte til endret subcellulær redistribusjon og dermed tap av aktivitet av proteasen(e).

Figur 4.3 A viser forekomst av cysteinproteasene legumain, cathepsin B og L, og ekspresjonen av alle tre proteasene ble kun påvist i membranfraksjonen bestående av membraner av cytoplasmatiske organeller, deriblant membraner i cytoplasmatiske vesikler, basalmembranen, og membraner i ER og Golgi. Ingen av proteasene ble vist hverken i fraksjoner fra cytosol, kjerne eller i cellerestene hverken før eller etter simvastatinbehandling. For å bekrefte at prosedyren var pålitelig, ble det tilsatt spesifikke antistoffer for proteiner tilhørende hver sin cellefraksjon. Som markører for renhet av cellefraksjonene ble antistoff mot membranbundet LAMP2 og løselig ariylsulfatase B brukt for membranfraksjonen,  $\alpha$ -tubulin for cytosolfraksjonen og lamin B for kjernefraksjonen.

Kondisjonerte medier fra tre forsøk med simvastatinbehandling ble også analysert for legumain. Tilstedeværelse av sekret legumain ble funnet som vist i figur 4.3 B. Resultatene viste en konsentrasjon av legumain på mellom 3000 og 4000 pg/ml, men det var ingen statistisk signifikante forskjeller mellom behandlede og ubehandlede myotuber.



**Figur 4.3 Immunblott av subcellulære fraksjoner av humane myotuber behandlet med og uten simvastatin (A) og forekomst av legumain i kondisjonert medium (B).** **A.** Et representativt blot (n=3) av subcellulære fraksjoner der myoblastene først ble sådd ut, proliferert og deretter differensiert i 25 cm<sup>2</sup>-flasker. På dag 5 av differensieringen ble flaskene behandlet med 0,1 % DMSO (kontroll) eller 30 µM simvastatin (SL). Etter 48 t behandling ble myotubene høstet og blottet med antistoff mot legumain, cathepsin B og L, LAMP2, arylsulfatase B,  $\alpha$ -tubulin og lamin B etter elektroforese. **B.** ELISA-målinger av legumain i kondisjonerte medier etter samme behandling som beskrevet over. Grafen viser legumainkonsentrasjon (pg/ml) angitt som gjennomsnittlige relative verdier  $\pm$  SEM (n=3).

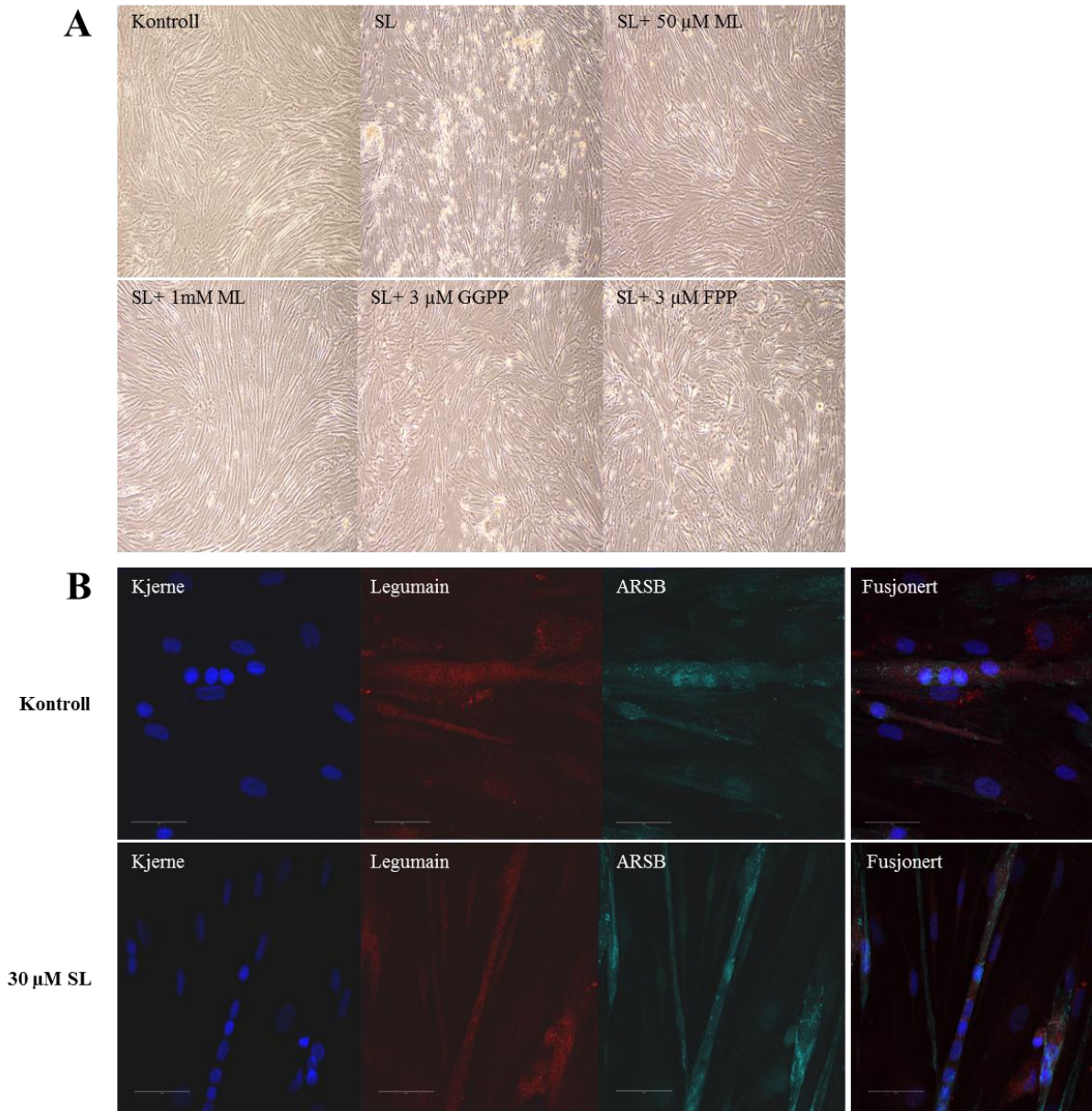
### 3.4 Morfologi og konfokalmikroskopistudier av myotuber

Myotubenes morfologi ble studert i lysmikroskop etter behandling i 48 timer med og uten 30 µM simvastatin sammen med 50 eller 1000 µM ML, 3 µM GGPP eller 3 µM FPP. Observasjonene er vist i figur 4.4 A. Ved simvastatinbehandling så det ut til at muskelfibrene mistet noe av sin elongerte form, og ble kortere. Flere celler løsnet også fra brønnoverflaten. Muskelfibrene ble derimot, som vist i figuren, delvis vedlikeholdt ved samtidig behandling



med 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  ML, 3  $\mu\text{M}$  GGPP og 3  $\mu\text{M}$  FPP, og i størst grad med de to førstnevnte behandlingene.

Figur 4.4 B viser humane myotuber fotografert i konfokalmikroskop. De øverste bildene viser kontrollcellene behandlet med 0,1 % DMSO, og de nederste bildene viser cellene behandlet med 30  $\mu\text{M}$  simvastatin. Kjernene vises i blått på grunn av DAPI som fester seg til dobbelttrådet DNA i kjernen, og emitterer lys ved 461 nm (blått lys). Legumain og aarylsulfatase B vises henholdsvis i rødt og grønt på grunn av eget fargevalg i Software. Bildene lengst til høyre er fusjonert, og viser både kjerne, legumain og aarylsulfatase B samtidig. Arylsulfatase B er et lysosomalt enzym, og det viste store likheter i lokalisasjonen mellom dette enzymet og legumain. De fusjonerte bildene viste en overlapping av fargene rødt og grønt, og påviste dermed en samlokalisering av henholdsvis legumain og aarylsulfatase B. Myotubene uttrykte relativt store mengder av legumain, men en spesifikk forskjell på innhold av legumain mellom simvastatinbehandlede og ubehandlede myotuber ble ikke observert.

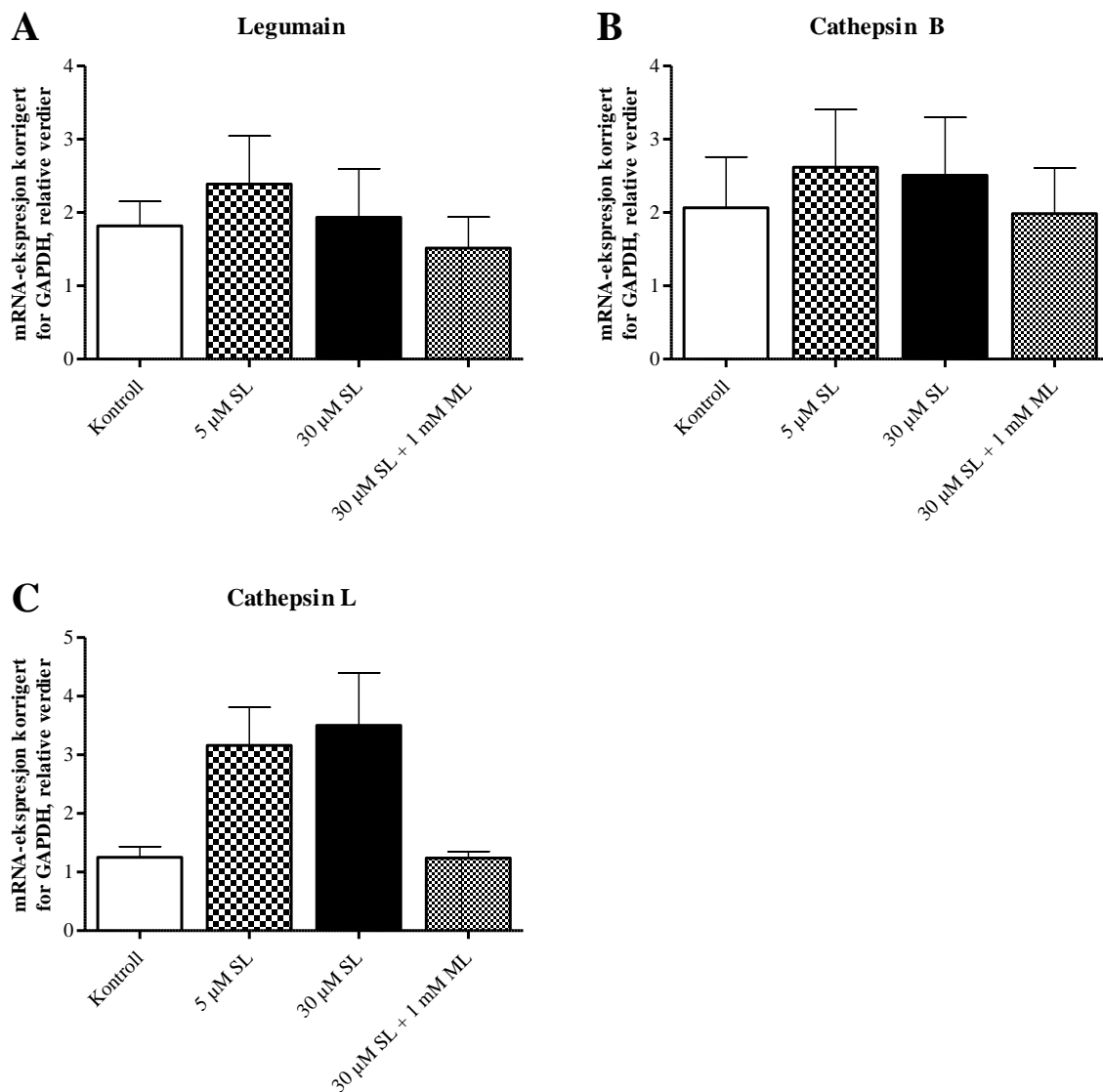


**Figur 4.4 Humane myotuber stimulert med simvastatin i 48 timer og studert ved hjelp av lysmikroskopi (A) og konfokalmikroskopi (B).** Humane myotuber ble sådd ut med omtrent 75 000 celler/brønn, proliferert og differensiert i 6-brønnersbrett. **A.** På dag 5 av differensieringen ble cellene stimulert i 48 t med 0,1 % DMSO (kontroll) eller 30 µM simvastatin (SL) med og uten 50 eller 1000 µM mevalonolakton (ML), 3 µM geranylgeranylpyrofosfat (GGPP) eller 3 µM farnesylpyrofosfat (FPP). Bildene ble tatt etter 48 timers behandling og ved 4 x forstørrelse. **B.** På dag 5 av differensieringen ble cellene stimulert i 48 timer med 0,1 % DMSO (kontroll) eller 30 µM SL. Figuren viser ferdig fikserte og permeabiliserte celler etter tilsetning av antistoffer for legumain og arylsulfatase B. Cellene er analysert med konfokalmikroskopi der kjernen er vist i blått, legumain i rødt og arylsulfatase B i grønt. Fusjonert bilde med både kjerne, legumain og arylsulfatase B er vist helt til høyre (n=1). ARSB; arylsulfatase B.

### **3.5 Effekten av simvastatin på mRNA-ekspressjon av legumain, cathepsin B og L i humane myotuber**

Tidligere studier har vist at atrofi og andre degenererende prosesser i skjelettmuskelceller har ført til oppregulering av mRNA for cathepsin B og L [48]. Legumain mRNA har derimot blitt påvist nedregulert i monocytter/makrofager isolert fra pasienter behandlet med atorvastatin [63]. Med bakgrunn i dette og resultater fra tidligere i oppgaven, var det derfor ønskelig å studere effekten av simvastatin på mRNA-ekspressjonen av legumain, cathepsin B og L. Messenger RNA-ekspressjonen ble analysert ved real-time-PCR, og resultatene er vist i figur 3.5, angitt som relative verdier normalisert og korrigert for «housekeeping»-kontrollen GAPDH.

Ekspressjonen av både legumain- (fig. 4.5 A) og cathepsin B mRNA (fig. 4.5 B) viste en liten tendens til oppregulering etter behandling med simvastatin alene. Samtidig behandling med mevalonolakton førte derimot til en forhindring av denne simvastatineffekten. Endringene var større for cathepsin L (fig. 4.5 C), og behandling med 5 eller 30  $\mu$ M simvastatin viste omtrent tre gangers økning av mRNA, men forskjellene var heller ikke her signifikante. En tendens til fullstendig forhindring av simvastatineffekten ble også observert ved samtidig behandling med mevalonolakton.



**Figur 4.5** Ekspresjon av mRNA for legumain (A), cathepsin B (B) og cathepsin L (C) i myotuber etter stimulering med simvastatin. Humane myotuber ble sådd ut med omtrent 75 000 celler/brønn, proliferert og differensiert i 6-brønnersbrett. På dag 5 av differensieringsperioden ble cellene inkubert med 5 eller 30  $\mu$ M simvastatin (SL) med og uten 1 mM mevalonolakton (ML) i 48 timer. Kontrollcellene ble inkubert med 0,1 % DMSO. Messenger RNA-ekspresjonen ble undersøkt ved real-time-PCR og spesifikke primere, og dataene er angitt som relative verdier til ubehandlede kontroller  $\pm$  SEM (n=3).

## 4 Diskusjon

Statiner har vært mye brukt som kolesterolsenkende midler helt siden det første statinet lovastatin kom på markedet i 1987 [1]. Høyt kolesterol, også kalt hyperlipidemi eller dyslipidemi, er en stadig økende risikofaktor for hjerte- og karsykdommer i befolkningen, og det foreligger god dokumentasjon på at statiner reduserer morbiditet og mortalitet knyttet til dette [3, 16, 18]. Denne legemiddelgruppen er generelt godt tolerert, men hos 10-12 % av statinbrukerne er det sett muskelrelaterte bivirkninger som myalgi, myositt, myopati og i verste fall rabdomyolyse som kan føre til død. Sistnevnte tilstand er den mest sjeldne [4, 19]. Selv om det finnes flere mulige predisponerende faktorer som kan føre til denne myotoksisiteten, er ikke mekanismen bak statininduserte muskelbivirkninger fullstendig klarlagt.

Tidligere har det blitt vist en sammenheng mellom statinindusert myotoksisitet og økt caspase-aktivitet i skjelettmuskelceller *in vitro* [29, 34, 41, 42]. Det ble i denne oppgaven lagt stor vekt på legumain, en asparaginyll endopeptidase som har store strukturelikheter med caspasene involvert i apoptose [70]. Legumain er ikke mye studert i humane skjelettmuskelceller, så for sammenligning er det i denne oppgaven tatt i bruk cathepsin B og L, som i likhet med legumain er velkjente lysosomale cysteinproteaser [52]. Cathepsin B og L er begge uttrykt i humane skjelettmuskelceller, og har vist seg å spille samme rolle som caspasene i apoptoseprosessen både i skjelettmuskelceller og andre celletyper [44, 48, 50].

### 4.1 Valg av cellemodeller

Statineffekter på humane myotuber ble studert *in vitro* ved å benytte primære humane skjelettmuskelceller som modellsystem. En slik cellemodell består av satellittceller isolert fra biopsier fra human skjelettmuskel, og opparbeides ved proliferasjon og differensiering. Satellittceller er enkjernede myogene forløperceller som er nødvendig for den regenerative kapasiteten til muskelfibre. I modne muskelfibre ligger satellittcellene i dvale, men blir aktivert ved skade. Aktiverte satellittceller kan enten proliferere til differensierte muskelceller og fusjonere med eksisterende muskelfibre, eller gi opphav til nye satellittceller [71, 72]. Satellittcellene vil ha den samme genotypen som muskelfibrene, og vil dermed også inneholde de samme underliggende genetiske variasjonene som kan være årsaken til muskelbivirkningene av statinene [73].

Det ble i denne oppgaven benyttet skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* fra friske frivillige, og valg av cellemodell er basert på tilgjengeligheten til de enkelte donorcellene under studien. De friske frivillige muskeldonorene er ikke tidligere eksponert for statiner, og reaksjonen på en eventuell statinbehandling er dermed ikke kjent. Predisponerende faktorer som andre sykdommer eller andre legemidler [4, 13, 15] og eventuelle genetiske mutasjoner [11] vil i dette tilfellet derfor spille inn. Det er også benyttet ulike donorer, slik at resultatene gjenspeiler et bredt utvalg av befolkningen med tanke på både kjønn og alder (Tab. 2.1)

## 4.2 Innvirkning av simvastatin på legumain, cathepsin B og L

Tidligere har det blitt vist i studier *in vitro* at statiner forårsaker muskelbivirkning ved å indusere apoptose i humane skjelettmuskelceller. Dette ser ut til å foregå via den mitokondrielle signalveien ved aktivering av caspase-3, -9 og Bax, et proapoptotisk protein som øker permeabiliteten til mitokondriene [29, 30]. Bax er i likhet med caspasene lokalisert i cytosol. Andre studier har vist at legumain har en antiapoptotisk effekt i tumorceller [56, 57], der en av hypotesene er inaktivering av caspase-7 og -9 eller caspase-8 i cytosol mediert via både dødsreseptor-signalveien og den mitokondrielle signalveien (Fig. 1.3). Årsaken til denne inaktiveringen er frigivelse av legumain til cytosol på grunn av endring av lysosompermeabiliteten i tidlig fase av apoptose. Resultatene vist i denne oppgaven med nedsatt legumainaktivitet i cellelysatenes etter simvastatinbehandling stemmer godt overens med tidligere studier gjort i humane skjelettmuskelceller som nevnt i starten av kapittelet [29, 30]. Samtidig ble legumain kun vist i membranfraksjonen etter subcellulær fraksjonering, og ingen tegn til lekkasje ut i cytosol eller til cellekjernen hverken før eller etter simvastatinbehandling ble observert. Dette er motstridende resultater i forhold til antagelsen om legumains apoptotiske effekt ved aktivering av caspase-3, -9 og Bax i cytosol etter simvastatinbehandling, og kan tyde på at legumain har innvirkning på apoptose andre steder enn i cytosol.

På grunn av den hemmende effekten simvastatin har på HMG-CoA-reduktasen, reduseres dannelsen av mevalonat. Reduksjonen av legumain- og cathepsin B-aktiviteten ved simvastatinbehandling ble i denne oppgaven forhindret ved samtidig inkubering med 50 eller 1000  $\mu$ M mevalonolakton, noe som kan tyde på at mekanismen bak simvastatins hemmende

effekt på aktiviten til legumain og cathepsin B skyldes hemmingen av HMG-CoA reduktase. For å bekrefte denne teorien ble det derfor gjort studier med FPP og GGPP som er videre nedstrømsprodukter i kolesterolsyntesen. Simvastatinbehandling sammen med FPP eller GGPP viste ikke en like stor forhindret effekt av simvastatin som antatt, men siden det kun ble benyttet 3  $\mu\text{M}$  av både GGPP og FPP i denne oppgaven, er det uvisst om høyere konsentrasjon kunne gitt større effekter. Samtidig var det ikke en nevneverdig stor forskjell på redusert simvastatineffekt mellom bruk av enten 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  mevalonolakton sammen med simvastatin. Ved å se på ekspresjonen av både legumain, cathepsin B og L, var ikke disse resultatene like overbevisende med tanke på forhindret simvastatineffekt ved samtidig behandling med ML, GGPP eller FPP. Noe av grunnen til dette kan være donorvariasjonene i forhold til cathepsin B og L, slik at noen av søylene kun baserer seg på én donor. Dette gjør det vanskelig å trekke noen konklusjoner, men i forhold til legumainekspresjonen var det GGPP som viste størst motvirkende effekt ved samtidig behandling med simvastatin. GGPP er et av de siste trinnene i kolesterolsyntesen, og regulerer dannelsen av ubiquinon (co-Q10), dolikol og isoprenylerte proteiner (Fig. 1.1). Sammen med FPP er GGPP essensiell for aktivering av små GTPaser, inkludert Rab, Ras og Rho-proteiner [37]. Effekten av simvastatin ble ikke forhindret i like stor grad ved samtidig behandling med FPP, og dette kan derfor tyde på at legemiddelet først og fremst hemmer GGPP, og dermed nedsetter geranylgeranyliseringen av for eksempel Rab1. Siden aktiveringen av GTPasen Rab1 kun blir isoprenylert av GGPP, og ikke FPP [74], er dette med på å bekrefte tidligere hypoteser [37], og kan tyde på at trafikkeringen av legumain fra ER til Golgi kan være hemmet av simvastatin via Rab1. Alt i alt er resultatene med på å vise at simvastatineffekten delvis er avhengig av hemmingen av HMG-CoA-reduktase.

### 4.3 Lokalisering av legumain i myotuber

Siden det ble vist en nedregulering av legumainaktiviteten ved simvastatinbehandling, var det interessant å tenke at dette var grunnet en mulig legumainlekkasje gjennom den lysosomale membranen. Lokaliseringen av legumain er som nevnt beskrevet i litteraturen i lysosomer/sene endosomer av cellen [53] hvor det skjer en fullstendig aktivering ved  $\text{pH} \leq 4,0$  [59].

Kolesterol er en essensiell membrankomponent i lysosomene, og har mye å si for membranpermeabiliteten. Statiners kolesterolsenkende effekt er derfor antatt å føre til

destabilisering av membranen, og frigivelse av enzymer og proteiner [32, 75]. På grunn av nedreguleringen av aktiviteten til både legumain, cathepsin B og L vist i denne oppgaven, var det av interesse å studere om nedgangen kunne være forårsaket av en eventuell lekkasje ut fra membranen til cytosol eller cellekjernen. Cytosol er som kjent pH-nøytral, og det var derfor antatt at blant annet en nedregulering av legumain i nøytral pH ville være årsaken til den nedregulerte aktiviteten. Metoden brukt til dette var subcellulær fraksjonering og konfokalmikroskopi, noe som ikke har blitt undersøkt på primære humane muskelceller tidligere.

Som vist etter subcellulær fraksjonering ble hverken legumain, cathepsin B eller L detektert i noen andre fraksjoner enn i membranfraksjonen. Renheten av den subcellulære fraksjoneringen ble også testet for å bekrefte at resultatene var pålitelige. LAMP2 er et lysosom-assosiert membranprotein, og ble påvist i membranfraksjonen. Arylsulfatase B, som er uttrykt i lumen på lysosomer/sene endosomer, var hovedsakelig også uttrykt i membranfraksjonen.  $\alpha$ -tubulin ble detektert både i cytosol og membran, men hovedsakelig i førstnevnte fraksjon. Dette proteinet er vist å være tilstede i cytoplasmatiske mikrotubuli like under plasmamembranen. Det fjerde og siste proteinet, Lamin B, er et kjerneprotein [76], men ble hovedsakelig funnet uttrykt i den fjerde og siste fraksjonen med cellerester. Likevel var proteinet noe uttrykt i kjernefraksjonen hos cellene behandlet med 30  $\mu$ M simvastatin. Årsaken til redusert legumainaktivitet etter simvastatinbehandling kan derfor ikke skyldes lekkasje ut fra membranen til cytosol eller kjerne. Bildene fra konfokalmikroskopiene bekreftet dette ved å vise tilstedeværelse av legumain i lysosomene i både kontroll og simvastatinbehandlede myotuber.

Nyere studier viser en nedsatt lysosomal funksjon i makrofager ved langtidsbehandling med glukose [77]. Forskningsgruppen ProTarg ved avdelingen utførte derfor nylig en studie for å undersøke simvastatineffekten på glukose-metabolismen i humane myotuber. Upubliserte data fra denne studien viser en signifikant nedgang i glukose-opptak og oksidering blant differensierte humane myotuber etter behandling med simvastatin, og en forhindret simvastatineffekt ble observert ved samtidig behandling med mevalonolakton. Disse observasjonene kan dermed være med på å belyse flere årsaker til statin-indusert myotoksisitet.



## 4.4 Simvastatin hemmer autoaktivering av prolegumain

En oppregulering av proformene til legumain, cathepsin B og L ble i denne oppgaven vist i myotuber etter behandling med simvastatin. Med en samtidig reduksjon av de aktive formene kan dette tyde på en hemmende effekt av simvastatin på autoaktiveringen fra proform til aktiv form for både legumain, cathepsin B og L. Det interessante i dette tilfellet er at legumain er beskrevet i litteraturen til å befinne seg i lysosomer/sene endosomer med pH 4.5–5.5 [78]. pH  $\leq 5,0$  er også vist å være en essensiell faktor for en begynnende aktivering av dette enzymet, der pH  $\leq 4,5$  er vist å gi fullstendig aktivering [59]. Den hemmende effekten på autoaktiveringen med simvastatin kan derfor tyde på en mulig forhøyet pH.

En årsak til forhøyet pH kan være svekket trafikkering av intracellulære vesikler, slik at legumain ikke befinner seg i lysosomene, men i Golgi eller ER der pH er høyere. Etter den subcellulære fraksjoneringen av myotubene behandlet med simvastatin ble det ikke vist tegn til lekkasje hverken til cytosol eller kjerne, og cysteinproteasene ble kun påvist i membranfraksjonen. Membranfraksjonen omtalt i denne oppgaven omfatter hovedsakelig alle membraner i cytoplasmatiske vesikler, basalmembranen, og membraner i ER og Golgi. Resultatene beviser dermed ikke at legumain kun befinner seg i lysosomene. Siden ER og Golgi også består av membraner som befinner seg i membranfraksjonen i denne oppgaven, og har en høyere pH enn lysosomene, stemmer dette bra med den antatte årsaken til hemmet autoaktivering av cysteinproteasene. Rab1 er som nevnt viktig i forhold til proteintransport fra ER til Golgi, og geranylgeranyliseres av GGPP. I en studie gjort på skjelettmuskelceller i rotter ved behandling med fluvastatin ble denne Rab1-transportøren hemmet, og førte dermed til videre hemming av vesikkeltransporten fra ER til Golgi [37]. Denne hemmingen kan også være med på å begrunne hvorfor aktivt legumain reduseres ved bruk av simvastatin på grunn av den forhindrede effekten ved samtidig behandling med GGPP.

Svekket trafikkering kan for eksempel tenkes å inntreffe ved endret sammensetning av fosfoinositoler. Fosfoinositoler er fosfolipider som utgjør omtrent 10 % av membranene i cellene, og har en viktig funksjon med hensyn på intracellulær målstyring av vesiklene [79, 80]. I tidligere studier der kolesterol ble fjernet fra membranen ved bruk av metyl- $\beta$ -cyklodekstrin, ble det sett endringer og delokaliseringer av fosfoinositolene [80]. Dette kan bety at simvastatin teoretisk sett også kan påvirke målstyringen av intracellulære vesikler, og dermed hindre transport til lysosomene og autoaktiveringen av cysteinproteasene.

## **4.5 Effekten av simvastatin på mRNA-ekspressjonen av legumain, cathepsin B og L**

Med grunnlag i resultatene fra denne oppgaven ser det ut til at simvastatin både reduserer aktivitet, proteinekspresjon og prosessering til aktiv form av legumain, samt reduserer aktiviteten til cathepsin B. Ekspresjonen av både cathepsin B og L så ikke ut til å bli påvirket i like stor grad av simvastatin, men på grunn donorvariasjonene, der noen donorer ikke uttrykte cathepsin B eller L i det hele tatt, var en eventuell simvastatineffekt vanskelig å bekrefte. Cathepsin L-aktiviteten ble ikke målt, men siden det er vist at mRNA av både cathepsin L og B er overuttrykt ved muskeltoksisitet [48], og i tillegg spiller en rolle i apoptose [43, 44], var det interessant å undersøke mRNA-ekspressjonen for alle disse tre cysteinproteasene. En annen årsak er at legumain også aktiverer både cathepsin B og L [58, 59].

Statiners påvirkning av genekspressjonen til legumain, cathepsin B og L er ikke tidligere studert i primære humane myotuber. En studie gjort på monocytter viser en signifikant nedregulering av legumain mRNA ved langtidsbehandling med lavdosert atorvastatin, men en signifikant nedregulering er ikke funnet ved korttidsbehandling med høydosert atorvastatin [63]. Resultatene i denne oppgaven viste derimot ikke tilsvarende nedregulerende effekt i myotubene. Det ble ikke vist noen statistisk signifikante forskjeller i mRNA med og uten simvastatinbehandling. En tendens til svak oppregulering av legumain- og cathepsin B mRNA ble vist etter simvastatinbehandling, mens den økende tendensen var større for cathepsin L mRNA etter samme behandling. Tendensen til oppregulering av cathepsinene stemmer godt overens med tidligere studier der cathepsin B og L er vist å være overuttrykt ved muskelatrofi [48].

## 5 Konklusjon

Simvastatin førte til en hemming av enzymaktiviteten til legumain og cathepsin B i primære humane myotuber. Begge cysteinproteasene fikk sammen med cathepsin L en redusert prosessering fra proform til aktiv form etter samme simvastatinbehandling, og effekten av simvastatin ble i stor grad forhindret ved samtidig behandling med ML eller GGPP, og i mindre grad med FPP. Myotubenes morfologi ble også påvirket etter behandling med simvastatin. Muskelfibrene ble kortere, og den elongerte formen forsvant. Denne effekten ble forhindret ved samtidig behandling med ML, GGPP og FPP, noe som tyder på at simvastatineffekten er tilknyttet hemmingen av HMG-CoA-reduktase.

Legumain, cathepsin B og L ble kun funnet i membranfraksjonen, og simvastatinbehandling ga ingen lekkasje fra lysosomene. Genuttrykket (mRNA) av både legumain, cathepsin B og L ble i tillegg oppregulert ved simvastatinstimulering. Disse resultatene viser at årsaken til redusert aktivitet og prosessering til aktiv form av cysteinproteasene ikke forårsakes av hverken lekkasje ut fra lysosomene eller hemming av mRNA-transkripsjonen.

# Litteraturliste

1. Backes, J.M., et al., *Does simvastatin cause more myotoxicity compared with other statins?* Ann Pharmacother, 2009. **43**(12): p. 2012-20.
2. Folkehelseinstituttet, *Reseptregisteret*, 2012: [www.reseptregisteret.no](http://www.reseptregisteret.no).
3. Folkehelseinstituttet, *Legemiddelforbruket i Norge*, 2012, [www.reseptregisteret.no](http://www.reseptregisteret.no).
4. Abd, T.T. and T.A. Jacobson, *Statin-induced myopathy: a review and update*. Expert Opin Drug Saf, 2011. **10**(3): p. 373-87.
5. Jeger, R. and T. Dieterle, *Statins: have we found the Holy Grail?* Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13515.
6. Mihaylova, B., et al., *The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials*. Lancet, 2012. **380**(9841): p. 581-90.
7. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 7th ed2011.
8. Stroes, E., *Statins and LDL-cholesterol lowering: an overview*. Curr Med Res Opin, 2005. **21 Suppl 6**: p. S9-16.
9. Baigent, C., et al., *Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials*. Lancet, 2010. **376**(9753): p. 1670-81.
10. Sakamoto, K., et al., *Rab-small GTPases are involved in fluvastatin and pravastatin-induced vacuolation in rat skeletal myofibers*. FASEB J, 2007. **21**(14): p. 4087-94.
11. Skottheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. Eur J Pharm Sci, 2008. **33**(4-5): p. 317-25.
12. Kearney, A.S., et al., *The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981*. Pharm Res, 1993. **10**(10): p. 1461-5.
13. Bellosta, S., R. Paoletti, and A. Corsini, *Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III50-7.
14. Martin, P.D., et al., *Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers*. Clin Ther, 2003. **25**(11): p. 2822-35.
15. Molden, E. and A. Åsberg, *Metabolismeinteraksjoner med statiner*. Tidsskriftet for Den norske legeforening, 2001. **Nr. 2**.
16. Helsedirektoratet, *Nasjonale retningslinjer for primærforebygging av hjerte- og karsykdommer*. 2009.
17. Martinez, L.R., et al., *Transfer of lipids to High-Density Lipoprotein (HDL) is diminished in patients with familial hypercholesterolemia*. Metabolism, 2013.
18. Nelson, R.H., *Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease*. Prim Care, 2013. **40**(1): p. 195-211.
19. Golomb, B.A. and M.A. Evans, *Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism*. Am J Cardiovasc Drugs, 2008. **8**(6): p. 373-418.
20. Tiwari, A., et al., *Statins and myotoxicity: a therapeutic limitation*. Expert Opin Drug Saf, 2006. **5**(5): p. 651-66.

21. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. Skjelettet og musklene. Vol. Kap. 6 2001, Oslo: Gyldendal Akademisk.
22. Obayashi, H., et al., *Cerivastatin induces type-I fiber-, not type-II fiber-, predominant muscular toxicity in the young male F344 rats*. J Toxicol Sci, 2011. **36**(4): p. 445-52.
23. Westwood, F.R., et al., *Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(2): p. 246-57.
24. Sathasivam, S., *Statin induced myotoxicity*. European Journal of Internal Medicine, 2012. **23**(4): p. 317-324.
25. Bruckert, E., et al., *Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study*. Cardiovasc Drugs Ther, 2005. **19**(6): p. 403-14.
26. Sirvent, P., et al., *Muscle mitochondrial metabolism and calcium signaling impairment in patients treated with statins*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **259**(2): p. 263-8.
27. Liantonio, A., et al., *Fluvastatin and atorvastatin affect calcium homeostasis of rat skeletal muscle fibers in vivo and in vitro by impairing the sarcoplasmic reticulum/mitochondria Ca<sup>2+</sup>-release system*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 626-34.
28. Nadanaciva, S., et al., *Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **223**(3): p. 277-87.
29. Sacher, J., et al., *Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(3): p. 1032-41.
30. Kwak, H.B., et al., *Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 198-207.
31. Sirvent, P., J. Mercier, and A. Lacampagne, *New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(3): p. 333-8.
32. Jadot, M., et al., *Effects of methylcyclodextrin on lysosomes*. Eur J Biochem, 2001. **268**(5): p. 1392-9.
33. Harper, C.R. and T.A. Jacobson, *The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis*. Curr Opin Lipidol, 2007. **18**(4): p. 401-8.
34. Johnson, T.E., et al., *Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **200**(3): p. 237-50.
35. Baker, S.K., *Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle toxicity*. Muscle Nerve, 2005. **31**(5): p. 572-80.
36. Henics, T. and D.N. Wheatley, *Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features*. Biol Cell, 1999. **91**(7): p. 485-98.
37. Sakamoto, K., I. Wada, and J. Kimura, *Inhibition of Rab1 GTPase and endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking underlies statin's toxicity in rat skeletal myofibers*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **338**(1): p. 62-9.
38. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
39. Dirks, A.J. and K.M. Jones, *Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1208-12.
40. Fromigue, O., et al., *RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation*. Cell Death Differ, 2006. **13**(11): p. 1845-56.

41. Matzno, S., et al., *Statin-induced apoptosis linked with membrane farnesylated Ras small G protein depletion, rather than geranylated Rho protein*. J Pharm Pharmacol, 2005. **57**(11): p. 1475-84.
42. Mutoh, T., et al., *Involvement of tyrosine phosphorylation in HMG-CoA reductase inhibitor-induced cell death in L6 myoblasts*. FEBS Lett, 1999. **444**(1): p. 85-9.
43. Repnik, U. and B. Turk, *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*. Mitochondrion, 2010. **10**(6): p. 662-9.
44. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Buhling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-9.
45. Turk, B. and V. Stoka, *Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins*. FEBS Lett, 2007. **581**(15): p. 2761-7.
46. Turk, V., et al., *Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer*. Adv Enzyme Regul, 2002. **42**: p. 285-303.
47. Vasiljeva, O., et al., *Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(4): p. 387-403.
48. Bechet, D., et al., *Lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 2098-114.
49. Ishidoh, K. and E. Kominami, *Processing and activation of lysosomal proteinases*. Biol Chem, 2002. **383**(12): p. 1827-31.
50. Turk, V., et al., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 68-88.
51. Turk, B., et al., *Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(4): p. 225-30.
52. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
53. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. Biochimie, 2012. **94**(12): p. 2590-9.
54. Haugen, M.H., et al., *Nuclear legumain activity in colorectal cancer*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52980.
55. Berven, L., et al., *Autoactivation of prolegumain is accelerated by glycosaminoglycans*. Biochimie, 2013. **95**(4): p. 772-81.
56. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2957-64.
57. Wu, W., et al., *Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 970-80.
58. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 777-83.
59. Dall, E. and H. Brandstetter, *Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2012. **68**(Pt 1): p. 24-31.
60. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. Biochem J, 1998. **335** ( Pt 1): p. 111-7.
61. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
62. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. Biochem J, 2000. **352** Pt 2: p. 327-34.

63. Wang, Z.H., et al., *Pleiotropic effects of atorvastatin on monocytes in atherosclerotic patients*. J Clin Pharmacol, 2010. **50**(3): p. 311-9.
64. Lutgens, S.P., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3029-41.
65. Jacobsen, L.L., *Er cysteinproteasene legumain og cathepsin B involvert i statinindusert myotoksisitet? (Universitetet i Oslo)*. 2012.
66. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 726-34.
67. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
68. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-283.
69. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L*. Methods in Enzymology, 1981. **80 Pt C**: p. 535-561.
70. Chen, J.M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. FEBS Lett, 1998. **441**(3): p. 361-5.
71. Morgan, J.E. and T.A. Partridge, *Muscle satellite cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1151-6.
72. Thornell, L.E., *Sarcopenic obesity: satellite cells in the aging muscle*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(1): p. 22-7.
73. Palacios, D. and P.L. Puri, *The epigenetic network regulating muscle development and regeneration*. J Cell Physiol, 2006. **207**(1): p. 1-11.
74. Khosravi-Far, R., et al., *Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6264-8.
75. Deng, D., et al., *Loss of membrane cholesterol influences lysosomal permeability to potassium ions and protons*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(2): p. 470-6.
76. Georgatos, S.D. and G. Blobel, *Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope*. J Cell Biol, 1987. **105**(1): p. 117-25.
77. Moheimani, F., et al., *Inhibition of lysosomal function in macrophages incubated with elevated glucose concentrations: a potential contributory factor in diabetes-associated atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **223**(1): p. 144-51.
78. Ying, L.Q. and B.P. Branchaud, *Selective labeling and monitoring pH changes of lysosomes in living cells with fluorogenic pH sensors*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(12): p. 3546-9.
79. Zefirov, A.L. and A.M. Petrov, *Lipids in the Processes of Exo- and Endocytosis of Synaptic Vesicles*.
80. Minogue, S., et al., *Relationship between phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis, membrane organization, and lateral diffusion of PI4KIIalpha at the trans-Golgi network*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2314-24.

# Vedlegg

## LØSNINGER

### 1. Celledyrking

---

#### 1.1 Utsåingsmedium

- 500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1
- 50 ml FCS (Føtalt kalveserum)
- 2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml
- 2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin B)

#### 1.2 Ekstracellulær matriks (ECM)

- 1 ml fortynnet ECM (5 ml ECM-gel i 70 ml utsåingsmedium)
- 4 ml utsåingsmedium

#### 1.3 Proliferasjonsmedium

- 500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1
- 10 ml FCS (Føtalt kalveserum)
- 10 ml Ultrose G
- 2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml
- 2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin B)

#### 1.4 Differensieringsmedium

- 500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1
- 10 ml FCS (Føtalt kalveserum)
- 2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml
- 2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin B)
- 25 pmol insulin

#### 1.5 10 x PBS (pH 7,3)

- 2 g KCl
- 80 g NaCl
- 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Ad 1 l destillert H<sub>2</sub>O
- Filtreres med 0,45 µm filter, og fortynnes 10 ganger med destillert H<sub>2</sub>O til 1xPBS



### 1.6 Lysisbuffer (pH 5,8)

14,71 g Natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,19 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

5 g (w/v) N-oktyl- $\beta$ -D-glukopyranosid

HCl/NaOH for justering av pH til 5,8

Ad 500 ml destillert  $\text{H}_2\text{O}$

## 2. Totalproteinmåling

---

### 2.1 Fortynnet fargereagens (1:5)

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

40 ml destillert  $\text{H}_2\text{O}$

## 3. Enzymaktivitetsmåling

---

### 3.1 Legumain-assaybuffer (pH 5,8)

39,5 mM Sitronsyre ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

121 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

0,01 % CHAPS

1 mM DTT (tilsettes rett før bruk)

### 3.2 Legumain-substratløsning (34 $\mu\text{M}$ )

200  $\mu\text{l}$  2,5 mM Z-Ala-Ala-Asn-AMC (løst i DMSO)

14,5 ml Legumain-assaybuffer

### 3.3 Cathepsin B-assaybuffer (pH 5,5)

200 mM Natriumacetat ( $\text{NaC}_2\text{H}_4\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

4 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

8 mM DTT (tilsettes rett før bruk)

### 3.4 Cathepsin B-substratløsning (68 $\mu\text{M}$ )

2 ml 1 mM Z-Arg-Arg-AMC (løst i DMSO)

27,4 ml destillert  $\text{H}_2\text{O}$

## 4. Immunblotting

---

### 4.1 Elektroforesebuffer

40 ml NuPage® MOPS SDS Running Buffer (20x)

Ad 800 ml destillert  $\text{H}_2\text{O}$

#### **4.2 LDS-prøvebuffer**

13 µl destillert H<sub>2</sub>O  
5 µl NuPage® LDS Sample Buffer (x4)  
2 µl 0,5 M DTT

#### **4.3 Blottebuffer**

12 g Tris (base)  
58 g Glysin  
800 ml Metanol  
Ad 4 l destillert H<sub>2</sub>O

#### **4.4 10 x T-TBS (pH 7,5) Høstsemester**

24,2 g Tris (base)  
146,8 g NaCl  
10 ml Tween 20  
Ad 2 l destillert H<sub>2</sub>O  
Filtreres med 0,45 µm filter, og fortynnes 10 ganger med destillert H<sub>2</sub>O til 1xT-TBS

#### **4.5 10 x T-TBS (pH 7,5) Vårsemester**

48,4 g Tris (base)  
220,2 g NaCl  
20 ml Tween 80  
Ad 2 l destillert H<sub>2</sub>O  
Filtreres med 0,45 µm filter, og fortynnes 10 ganger med destillert H<sub>2</sub>O til 1xT-TBS

#### **4.6 Blotto**

10 g fettfri tørrmelk  
20 ml 10xT-TBS  
Ad 200 ml destillert H<sub>2</sub>O

#### **4.7 Strippebuffer**

10 ml Restore™ Western Blot Stripping Buffer

### **5. «Enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA)**

---

#### **5.1 Vaskebuffer**

0,5 ml Tween  
Ad 1 l 1xPBS

#### **5.2 Fortynningsreagens**

100 µl Reagent Dilution  
ad 1 ml destillert H<sub>2</sub>O

### 5.3 Stoppløsning

5,33 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Ad 100 ml destillert H<sub>2</sub>O

## 6. RT-real-time-PCR

---

### 6.1 Reaksjonsmix til cDNA-syntese

x µl RNA-prøve (0,5 eller 2 µg total-RNA)

ad 13,2 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O

2 µl 10xRTBuffer

0,8 µl 25xdNTP mix (100 mM)

2 µl 10xRandom Primers

1 µl RNase inhibitor

1 µl Multiscribe Reverse Transcriptase

### 6.2 Reaksjonsmix til real-time-PCR

12,5 µl 2xSYBR Green Master Mix

0,25 µl 30 µM Primer F (forward)

0,25 µl 30 µM Primer R (reverse)

9,5 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O

## 7. Konfokalmikroskopi

---

### 7.1 Paraformaldehyd 4 %

0,625 ml av 32 % paraformaldehydløsning

5 ml 1xPBS

### 7.2 Triton X-100 0,2 %

0,01 ml Triton X-100

4,99 ml 1xPBS

### 7.3 IF-buffer

25 ml 10xPBS (Vedlegg 1.5)

0,25 ml BSA

0,5 ml Triton X-100

0,13 ml Tween 20

224 ml destillert H<sub>2</sub>O

### 7.4 Hesteserum 10 %

2 ml hesteserum

18 ml 1xPBS

## POSTER

### 8. Poster

---

**Sted:** Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT) Vintermøte

**Tid:** 24.-27. januar 2013

**Kategori:** Basalfarmakologi

**Tittel:** The cysteine protease legumain is down-regulated by simvastatin in primary human skeletal muscle cells

**Poster:** Neste side



## The cysteine protease legumain is down-regulated by simvastatin in primary human skeletal muscle cells

VORELAND AL, SMITH R, THORESEN GH, JOHANSEN HT, SOLBERG R

Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, PO Box 1068 Blindern, 0136 Oslo, norway@pharm.uio.no

### INTRODUCTION

To treat hypercholesterolemia and to reduce cardiovascular events, statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors) are prescribed drugs that are widely used. Statins are generally well tolerated, but in some cases they can cause serious adverse effects like myotoxicity, ranging from mild myopathy to serious rhabdomyolysis. The mechanism of statin-induced myotoxicity is not yet fully understood and several hypotheses have been proposed. Our focus is legumain, a lysosomal cysteine protease that is ubiquitously expressed, and which shows structural similarities with the caspases involved in apoptosis. Also, the mRNA expression of legumain in macrophages are reduced in patients treated with statins. Therefore, we want to study possible correlations between effects of simvastatin on legumain, as well as cathepsin B and L, in primary skeletal muscle cells (myotubes).

### METHODS

Differentiated primary human skeletal muscle cells isolated from *M. obliquus internus* abdominis from healthy living donors were used as cell models. Legumain was analyzed in cell lysates by immunoblotting and enzyme activity measurements, and subcellular localization of legumain was investigated by subcellular fractionation (Qiagen subcellular fractionation kit). Furthermore, the myotubes were investigated by confocal imaging using primary antibodies against legumain (red) and acryl sulphatase A (AKSA, cyan 50), whereas nuclei were visualized by DAPI (blue).

### RESULTS

#### Simvastatin reduces legumain activity

- Simvastatin (30  $\mu$ M) reduced legumain activity with approximately 30-40 %.
- Legumain activity was partly restored when simvastatin was co-incubated with mevalonolactone (ML) or farnesyl pyrophosphate (FPP).

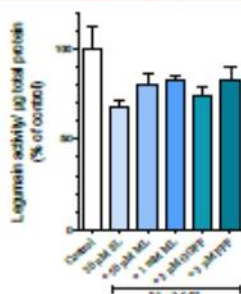


Figure 1. Legumain activity in human myotubes. Legumain activity in cell lysates after 48 h treatment as indicated, analyzed by using the fluorogenic legumain-specific peptide substrate Z-Ala-Ala-Arg-AMC ( $n=6$ ). ML, mevalonolactone; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranyl-geranyl pyrophosphate; SL, simvastatin.

#### Expressions of legumain, cathepsin B and cathepsin L are regulated by simvastatin

- An accumulation of prolegumain (56 kDa) and a subsequent decrease in mature legumain (36 kDa) was observed after treatment with simvastatin (30  $\mu$ M).
- The accumulation of prolegumain by simvastatin was partly reversed after treatment with 1 mM mevalonolactone, 3  $\mu$ M GGPP or 3  $\mu$ M FPP. Also, GGPP was able to reverse the down-regulation by simvastatin of the active (mature) legumain form.
- Simvastatin had minor effects on expression of cathepsin B or L.

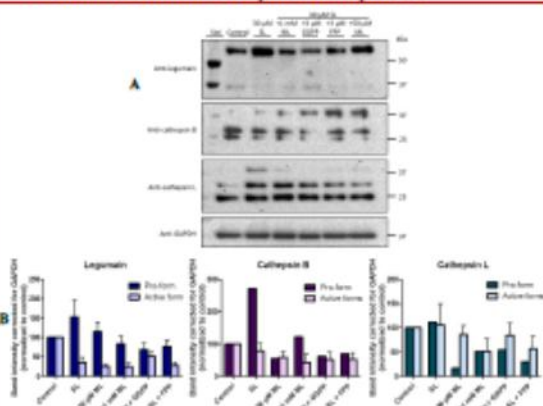


Figure 2. Expressions of legumain, cathepsin B and cathepsin L. Myotubes were treated for 48 h as indicated. A representative immunoblot of cell lysates (A) and the corresponding band intensity calculated for legumain, cathepsin B, and cathepsin L, respectively (B), is shown ( $n=6$ ). GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (loading control).

#### Legumain, cathepsin B and cathepsin L are found in the membrane fraction of myotubes

- Legumain, cathepsin B and L were only found in the membrane fraction, which contains membrane proteins and proteins from the lumen of organelles (e.g. lysosomes).
- No leakage of the cysteine proteases to other cell compartments was observed after myotube treatment with simvastatin (30  $\mu$ M).

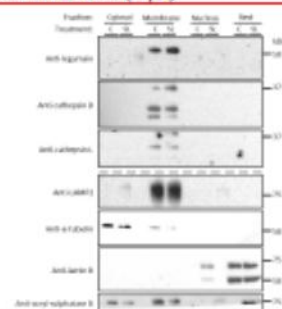


Figure 3. Subcellular fractionation of myotubes. Myotubes were treated with or without simvastatin (30  $\mu$ M) for 48 h before subcellular fractions were isolated. Immunoblots from one representative experiment are shown ( $n=3$ ). C, control; SL, simvastatin; LAMP2, lysosomal associated membrane protein-2.

#### Vesicular localization of legumain in myotubes

- Simvastatin (30  $\mu$ M) induced morphological changes in the myotubes. The influence of simvastatin was totally reversed after co-incubation with mevalonolactone (ML;  $\geq 50$   $\mu$ M), and partly reversed after co-incubation with geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP; 3  $\mu$ M) or farnesyl pyrophosphate (FPP; 3  $\mu$ M) (Fig. 5A).
- Myotubes expressed vesicular legumain, but only partly co-localized with acryl sulphatase A (AKSA) in the lysosomes (Fig. 5B).
- No obvious difference in legumain cellular distribution was observed after simvastatin (30  $\mu$ M) treatment (Fig. 5B).

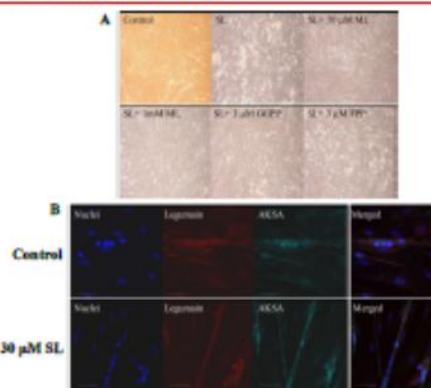


Figure 4. Light (A) and confocal (B) microscopy of myotubes. A. Myotubes were cultured, differentiated, and incubated for 48 hours with the respective treatments as described and visualized by phase contrast images 4X. B. Differentiated myotubes were incubated for 48 h with 30  $\mu$ M simvastatin (SL) prior fixation and analyzed by confocal microscopy. Legumain (red), acryl sulphatase A (AKSA, cyan 50), nuclei (DAPI, blue). Scale bars, 50  $\mu$ m. FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranyl-geranyl pyrophosphate; ML, mevalonolactone; SL, simvastatin.

### CONCLUSION

- Simvastatin inhibits activity of legumain (Fig. 1), probably by inhibiting the processing of prolegumain (56 kDa) to the active form (36 kDa; Fig. 2).
- The mechanism for reduced expression and activity of legumain (Fig. 1, 2) are not due to lysosomal leakage of legumain (Fig. 3, 4). Statins have been suggested to deplete cholesterol from the various cell membranes, but this is not sufficient to alter legumain distribution in myotubes. Thus, other mechanisms have to be involved for statin-induced inhibition of legumain processing and activity, and further studies are needed.